

Strukturermittlung am α - Amanitin

Peter Pfaender

Frankfurt am Main 1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546707_0066

S T R U K T U R E R M I T T L U N G A M α - A M A N I T I N

Inauguraldissertation zur Er-
langung des Doktorgrades der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt
von
Peter Pfaender
Frankfurt (Main)
1963

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



Dekan: Prof. Dr. Th. Wieland

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. Wieland

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. W. Diemair

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 5. 1963

Tag der Promotion: 29. 7. 1963

Meinem hochverehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Th. Wieland,
danke ich herzlich für die
Überlassung des Themas, die
vielen wertvollen Hinweise und
die grosszügige Unterstützung
dieser Arbeit.

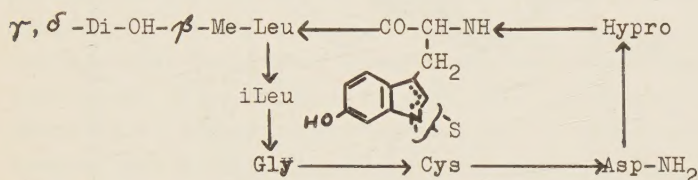
I N H A L T S V E R Z E I C N I S

	Seite
Einleitung	1
Veränderungen des Chromophorsystems und Abbauversuche	1
Untersuchungen am Chromophor	8
Diskussion der Ergebnisse und ergänzende Versuche	15
Massenspektrographische Ergebnisse	17
Pauly-Reaktionen verschiedener Indolsysteme und Diskussion von UV-Spektren	19
Zur Frage der Schwefelbindung	26
Kernresonanz-Spektroskopie	32
Pyrolyse und Gaschromatographie	47
Zusammenfassung	56
Experimenteller Teil	57

Einleitung.

Als Fortsetzung der Arbeiten über die Strukturaufklärung des α -Amanitins ¹⁾, ²⁾ sollte in dieser Arbeit die Struktur des Chromophors im Amanitin, des "Tryptophan-Derivates", und die Bindung des Schwefels an diesem Tryptophan-Derivat ermittelt werden.

Der letzte Strukturvorschlag ²⁾, von dem ausgegangen wurde, gab folgende Formel für α -Amanitin wieder:



Die Sequenz der Aminosäuren schien weitgehend in der gezeigten Weise gesichert zu sein; die Stellung des Schwefels am Tryptophan-Baustein war noch nicht bestimmt. Nachdem man früher ¹⁾ ausser der OH-Gruppe noch eine NH_2 -Gruppe im Benzolkern angenommen hatte, war diese später ²⁾ nicht mehr betrachtet worden. Das Cystein konnte nach Art einer Sulfensäure an das Tryptophan-Derivat gebunden sein.

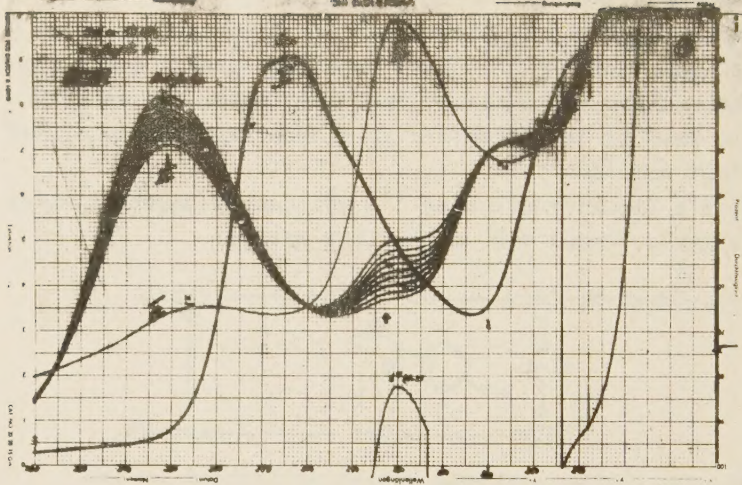
- - - - -

Veränderungen des Chromophorsystems und Abbauprobversuche.

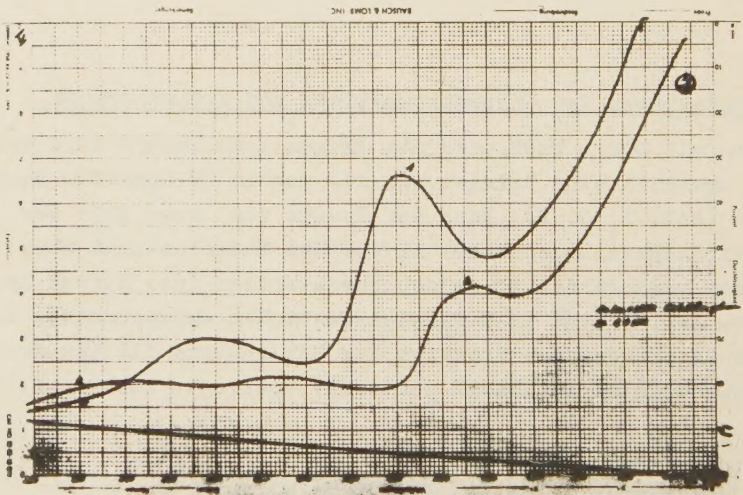
Schon mit 0,2 n NaOH oder mit 1%igem Ammoniumhydroxyd erleidet das Amanitin eine Umlagerung, die man im UV-Spektrum beobachten kann (Abb. 1, S. 2). Nach dem Zusatz von Lauge geht das Amanitinspektrum zunächst in das des Phenolat-Ions über ¹⁾, dieses verändert sich jedoch **rasch** weiter (die Kurven bei II in Abb. 1 sind in 3-Minuten-Abständen aufgenommen), bis nach 24 Stunden das Spektrum des Chromophors III (in der angegebenen Menge Alkali gemessen) vorliegt. Abb. 2, S. 2 zeigt

¹⁾Dissertation A. Höfer, Frankfurt/M, 1957

²⁾Th. Wieland, Helv. Chim. Acta 44 (1961); 919-926



UV-Spektrum: Umlagerung von α -Amanitin mit 0,2 n NaOH.
 I = α -Am; II = Phenolat-Ion von α -Am; III = nach Umlagerung
 (alkalische Form). (Abb. 1)



UV-Spektrum: α -Am nach Umwandlung mit NaOH.
 1 = alkalische Form; 2 = saure Form (Abb. 2)

nochmals den nun gebildeten Chromophor nach Ablauf der Umwandlung des Amanitins mit NaOH in der alkalischen (1) und der sauren Form (d.h. 1 nach der Zugabe von HCl). Wir haben auch nach der Umwandlung noch ein Phenol vor uns, was die starke Verschiebung ($279 \text{ m}\mu \rightarrow 263 \text{ m}\mu$) von $16 \text{ m}\mu$ zeigt. Bei Amanitin selbst beträgt die Verschiebung $20 \text{ m}\mu$.

Wir wissen auch heute noch nicht, was für eine Umwandlung mit NaOH bewirkt wird. Man kann nur sagen, dass ein Umbau des Chromophors stattfinden muss, derart, dass mindestens eine Doppelbindung mehr in Konjugation zum ursprünglichen Chromophorsystem tritt.

Die zunächst farblosen Lösungen des Amanitins werden nach Zusatz von Lauge allmählich gelb. Die Umwandlung lässt sich nicht durch Reduktionsmittel wie $\text{S}_2\text{O}_4^{--}$, SO_3^{--} und BH_4^- hemmen; das UV-Spektrum ändert sich nicht.

Nach schonend ausgeführtem alkalischem Abbau des Amanitins mit Anionenaustauschern bei Zimmertemperatur zeigte das Pherogramm bei pH 6,5 (Abb. 3, S. 4) ungeöffnetes (lactonisiertes) und umgelagertes Amanitin-Partialhydrolysat (2), daneben geöffnetes Lacton, ebenfalls am Chromophor umgelagert (1), und eine weitere Ninhydrin-negative, schwach Pauly-positive Komponente (Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure gelbrot), die zur Anode wanderte.

Beim Abbau des Amanitins mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (halbgesättigt) bei 90°C . treten bis zu 14 Ninhydrin- und/oder UV-positive Komponenten auf. Diese Mannigfaltigkeit ist verständlich, denn allein schon eine am Cystin durchgeführte alkalische Modellhydrolyse (ebenfalls wie beim Amanitin 1 Stunde mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ hydrolysiert) gibt 9 Komponenten, unter denen Alanin und Glycin identifiziert werden konnten (Abb. 4, S. 6).

Auch schonender Abbau mit verdünnter HCl (2 n) oder Kationenaustauschern brachte nur eine Aufspaltung des Moleküls in sehr viele Peptidbruchstücke, von denen noch einige den veränderten Amanitinchromophor zeigten (Abb. 5, S. 4).

Amanitinlösung wurde einen Tag lang mit einem grossen Überschuss von Kationenaustauscher (Dowex 50 X 8) geschüttelt. Die überstehende Lösung (Bild 5, rechts) und die mit heissem Wasser aus dem Austauscher eluierte Substanz wurden verglichen. (2) dürfte wieder geöffnetes, umgelagertes Amanitin sein, (1) Cysteinsäure und Chromophor-Bestandteile, die hier nicht

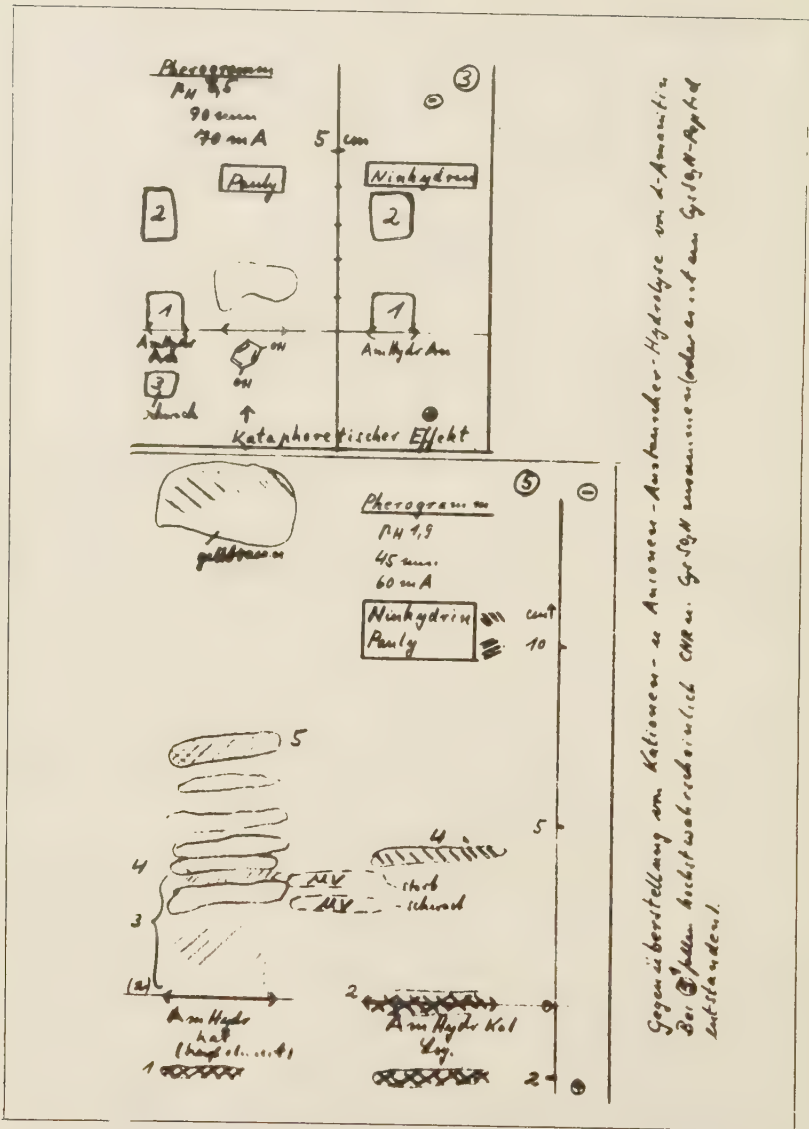


Abb. 3: Pherogramm bei pH 6,5 von mit Anionenaustauscher behandeltem d-Am (Am Hydr An).

Abb. 5: Pherogramm bei pH 1,9 von mit Kationenaustauscher behandeltem d-Am (Am Hydr Kat).

getrennt werden. Von (2) bis (4) tritt im Eluat (Bild 5, links) eine verschmierte, Pauly-positive Zone auf, also in keinem Fall ein einheitlicher Körper.

Mit 2 n HCl bei 110°C. im geschlossenen Röhrchen ausgeführte Hydrolysen brachten keine nennenswerten Fortschritte.

Die Hydrolysate wurden mit einem pH-Gradienten über eine 80 cm lange Dowex 50 X 8 Kationenaustauschersäule bei 50°C. geschickt. Die mit $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ -Gradienten von pH 2,8 bis 5,0 eluierten Peptide wurden in 3-cm³-Fraktionen aufzufangen, im UV gemessen und pherographisch untersucht.

Einen Ausschnitt aus solch einer "Trennung" zeigt Abb. 6 (s.S. 7) anhand der aufgenommenen UV-Spektren. Man sieht von Gläschen zu Gläschen fortschreitend ein Zu- und wieder Abnehmen der Extinktion des Chromophors mit Maxima bei 263 und 338 m μ , der grosse Ähnlichkeit mit dem aus dem alkalischen Abbau (Abb. 2, S. 2) aufweist. Betrachtet man das Verhältnis der Extinktionen der erwähnten Maxima in Abb. 6, so könnte man ein Gemisch zweier Chromophore vermuten, von denen einer nur ein Maximum bei 263 m μ zeigt.

Pherogramme der einzelnen Fraktionen zeigten, dass sie bis zu 14 grösstenteils Ninhydrin-positive Komponenten aufweisen können. Eine weitere Auftrennung wurde daher als zu schwierig angesehen.

Die erneute Überprüfung der sauren Hydrolyse mit azeotrop destillierender HCl im geschlossenen Röhrchen bei 110°C. und die Auswahl der richtigen Hydrolysenzeit brachte als Endresultat zum ersten Male einen Körper, der gegen weitere saure Hydrolyse beständig war und kristallin erhalten werden konnte.

Peptide werden erst vollständig gespalten, wenn sie 12 bis 15 Stunden bei 110°C. mit halbkonz. HCl erhitzt werden.

α -Amanitin wurde 5, 10 und 15 Stunden (C, B und A in Abb. 7, S. 7) hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum auf eine 60-cm-Sephadex-Säule (Sephadex G 25 Medium) gegeben und die aufgetrennten Produkte in 3-ml-Fraktionen aufgefangen, nachdem sie im Uvicord (registrierendes Durchflussskolorimeter zur Messung der Gesamtextinktion bei 253,7 m μ) gemessen worden waren. (Die Pfeile mit den Zahlen beziehen sich jedesmal auf die betreffende Fraktion).

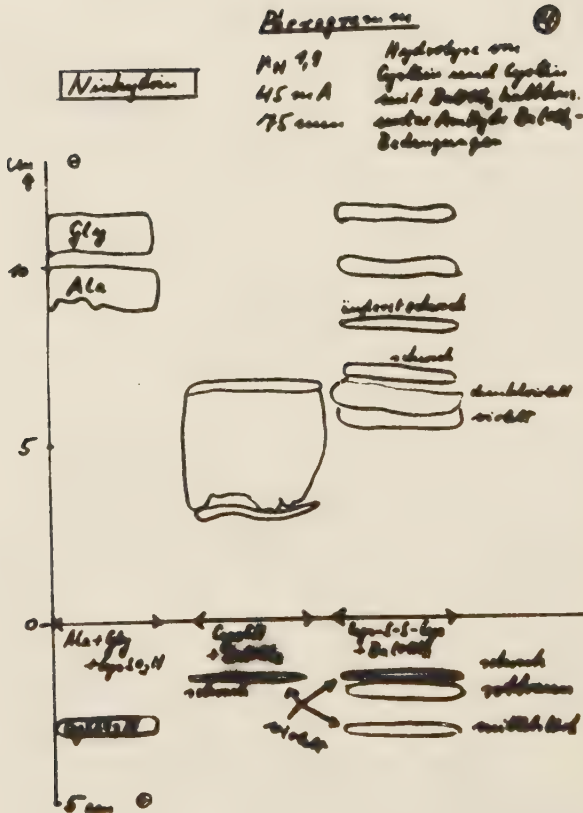


Abb. 4: Pherogramm bei pH 1,9 von unter den Bedingungen der alkalischen Amanitin-Hydrolyse verändertem Cystein und Cystin.

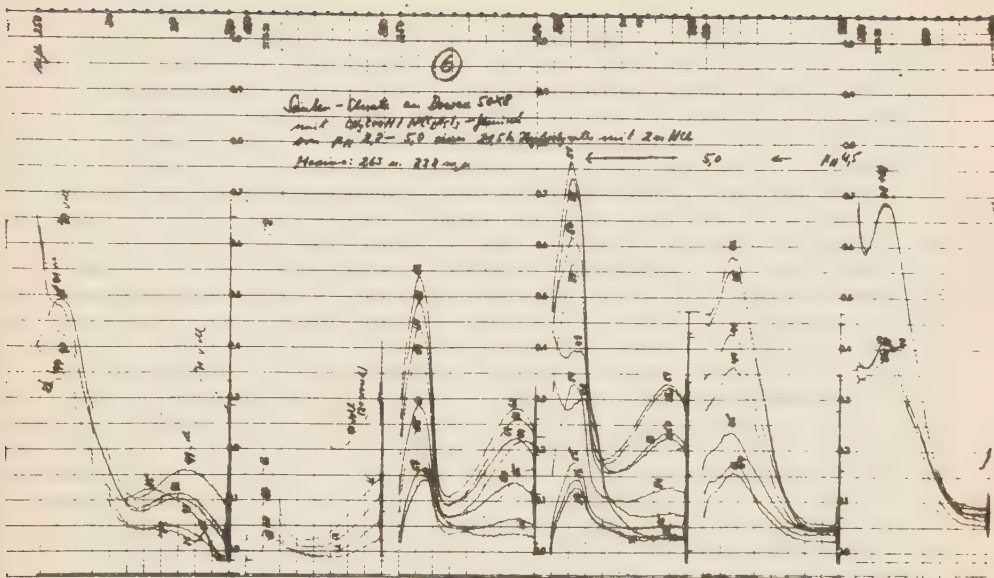
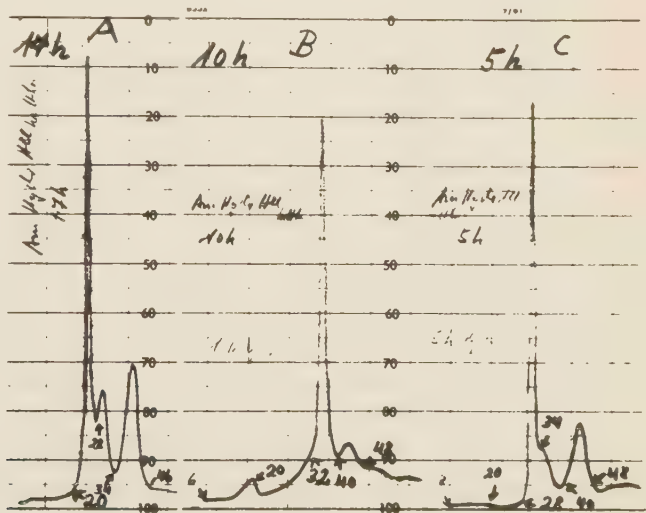


Abb. 6: UV-Spektren von Säulen-Eluaten an Dowex 50 X 8 eines 21,5-h-Hydrolysates von α -Am mit 2 n HCl. Gradienten-Elution von pH 2,8 - 5,0 mit $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ -Gemisch. (Maxima: 263 und 338 $\text{m}\mu$).

Abb. 7: 4 mg α -Am bei 110°C mit halbkonz. HCl 5 Std. C 10 Std. B 17 Std. A hydrolysiert.



60 cm Sephadex G 25 Medium Säule. Registriert mit Uvicord bei 253,7 $\text{m}\mu$. Elutionsmittel H_2O .

Man sieht, dass mit fortschreitender Hydrolysendauer das zuerst die Säule verlassende Produkt (20 bis 28) die Hauptmenge abgibt. In den ersten beiden Peaks (20-28; 29-34) ist, wie sich bei den folgenden präparativen Ansätzen herausstellte, die Hauptmenge des neuen Chromophors (CHR) enthalten.

Abb. 8, S. 9 zeigt einen solchen präparativen Ansatz, der auf einer 64 cm langen Sephadex-G-25-Medium-Säule von 1,8 cm Durchmesser mit 230 mg Hydrolysat gereinigt wurde. Die vereinigten Fraktionen 37-51 dienten zur Gewinnung des Chromophors, der nach ca. 1 Woche aus der wässrigen gelben Lösung in warzenförmigen Kristallen ausgefallen war. Durch Craig-Verteilung zwischen n-Butanol und Wasser konnte aus der Mutterlauge aus der wässrigen Phase noch etwas von dem Chromophor gewonnen werden. Trotzdem sind die Ausbeuten an diesem Produkt sehr schlecht. Aus 1 g Amanitin konnten bisher nur 3 mg Chromophor in reiner Form gewonnen werden. Ein grosser Teil der Substanz geht bei der sauren Hydrolyse durch Verharzung verloren; weiterhin entstehen viele Nebenprodukte. Ferner muss die Substanz sehr oft umkristallisiert werden, um sie von den Resten hartnäckig anhaftender Aminosäuren zu befreien.

Die Butanolfractionen der Craig-Verteilung und die folgenden Fraktionen des Sephadex-Eluates dienten zur Aufarbeitung der Nebenprodukte, deren Untersuchung erst in den Anfängen steht.

Untersuchungen am Chromophor.

Das UV-Spektrum des durch saure Totalhydrolyse gewonnenen Chromophors (CHR) zeigt Abb. 9, S. 9.

Die saure Form hat Maxima bei 212, 249 und 318 $m\mu$, sowie ein sehr flaches Maximum bei ca. 370 $m\mu$ und eine Schulter bei 285 $m\mu$; die alkalische Form hat Maxima bei 218, 259, 380 $m\mu$ (letzteres sehr flach).

Bis jetzt kann dem UV-Spektrum keine Chromophorklasse zugeordnet werden. Auffallend ist die wesentlich geringere Verschiebung der Maxima bei Zusatz von Alkali zur sauren Form (10 $m\mu$). Die OH-Gruppe an CHR ist aber gesichert, weil die Reaktion nach Pauly mit diazotierter Sulfanilsäure auch hier positiv ist und eine gelbrote Farbe gibt.

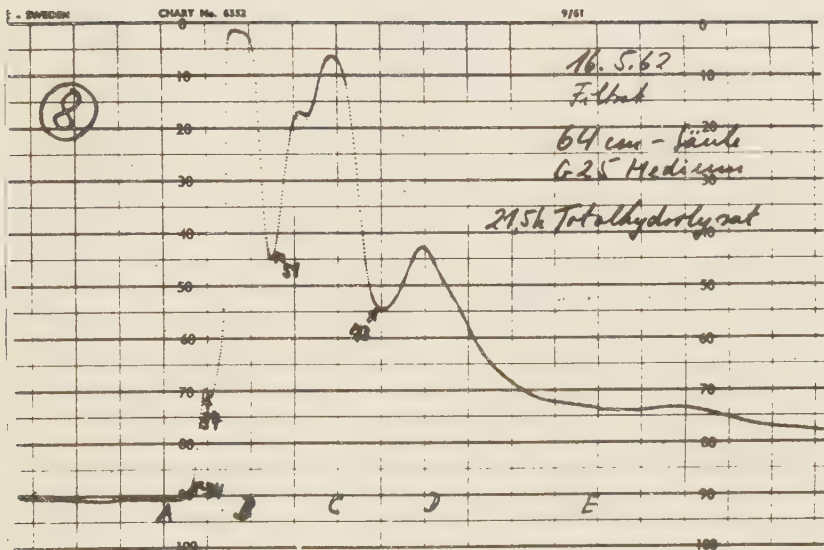


Abb. 8: 230 mg 21,5-h-Totalhydrolysat von α -Am, eluiert mit H_2O an 64 cm Sephadex G 25 Medium. Registriert mit Uvicord (3-ml-Fractionen).

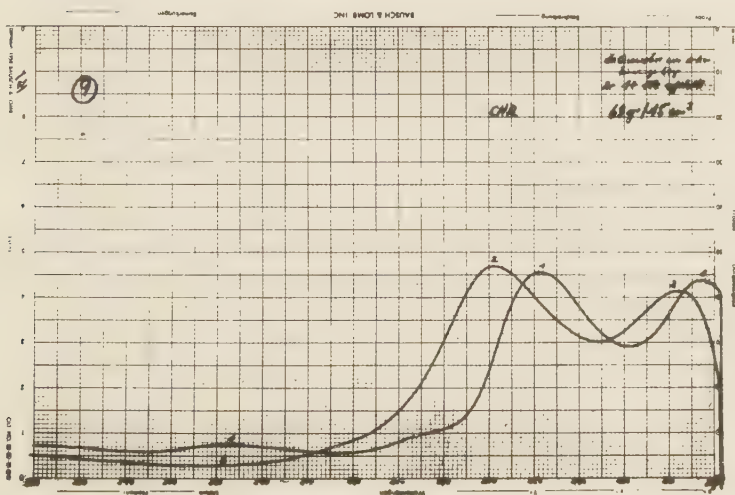
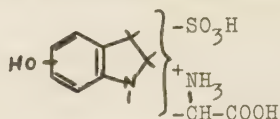


Abb. 9: Chromophor CHR aus α -Amanitin-Totalhydrolysat.
UV-Spektrum: 1 mit HCl; 2 mit NaOH.

Zunächst glaubten wir an folgende Gruppierung im Chromophor:



CHR wandert nämlich im Pherogramm bei pH 1,9 zur Anode (Abb. 11, S. 11), was auf eine Sulfonsäuregruppe zurückgeführt wurde. Es zeigt scheinbar Ninhydrin- und Pauly-positive Reaktion. Im Pherogramm fällt jedoch CHR mit der bei der Totalhydrolyse entstehenden Cysteinsäure (CysSO_3H) zusammen.

Ein Pherogramm bei pH 6,5 zeigte dann, dass CHR Ninhydrin-negativ und Pauly-positiv ist und viel weniger weit zur Anode wandert als CysSO_3H (Abb. 10, S. 11). Somit konnte die Aminosäuregruppierung fallengelassen werden. Weiterhin wurde bei der qualitativen Analyse von CHR kein Schwefel gefunden. So schied auch die Gruppierung $-\text{SO}_3\text{H}$ aus.

Es zeigte sich zwar, dass auch Carbonsäuren mit Dissoziationskonstanten ab 10^{-3} (und grösser) auch bei pH 1,9 im Pherogramm zur Anode laufen können (Abb. 12, S. 12), allerdings nur eine etwa halb so grosse Strecke, wie sie in der gleichen Zeit von CHR zurückgelegt wird. Zunächst kann nicht erklärt werden, warum CHR bei pH 1,9 im Pherogramm so weit wandert.

Weiteren Aufschluss über im CHR vorhandene Gruppen gab das IR-Spektrum (Abb. 13 und 14, S. 13). 0,55 mg des kristallisierten reinen Chromophors wurden nach der üblichen Technik in einer normalen (250 mg) KBr-Tablette gemessen. Die darauf zweimal in D_2O aufgelöste und im Vakuum wieder zur Trockene gebrachte Tablette gab noch ein wesentlich besser aufgelöstes Spektrum:

Der Hauptteil der $(\text{OH}[+\text{NH}])$ -stretching-Schwingungen ist aus dem Bereich von 3500 nach 2500 cm^{-1} verschoben worden (Abb. 14), entsprechend den neu auftretenden $(\text{OD}[+\text{ND}])$ -stretching-Schwingungen, so dass jetzt deutlich der Benzolaromat (3080 cm^{-1}) und die CH_2 - und CH_3 -stretching-Schwingungen (2950 cm^{-1}) zu sehen sind. Im CO-Bereich ist deutlich eine $\text{C}=\text{O}$ -Bande (1725 cm^{-1})

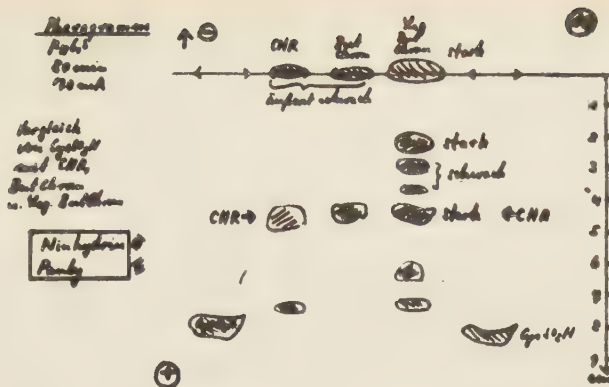


Abb. 10: Pherogramm pH 6,5; Vergleich von CHR, CHR-Craig-Verteilungsprodukten und CysSO₃H

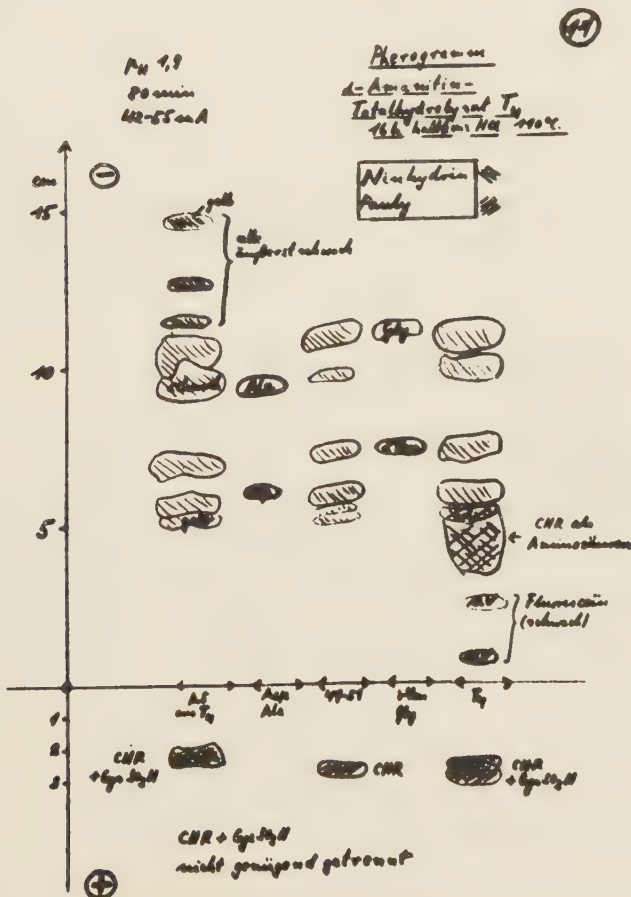


Abb. 11: Pherogramm pH 1,9, α -Amanitin-Totalhydrolysat

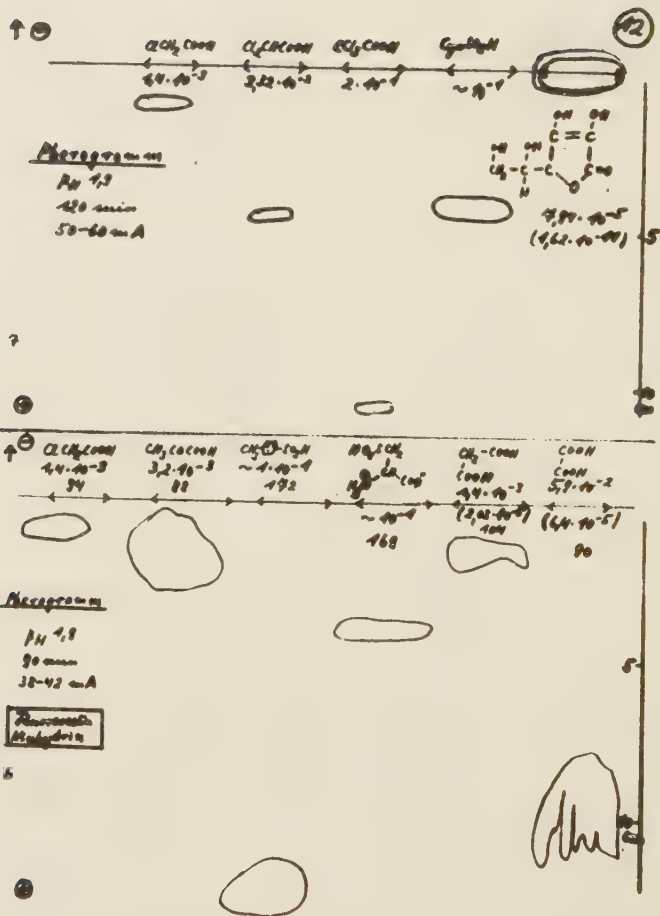


Abb. 12: Pherogramme bei pH 1,9; Vergleich der Laufstrecke von Carbonsäuren verschiedener Dissoziations-Konstanten mit der von Cysteinsäure.

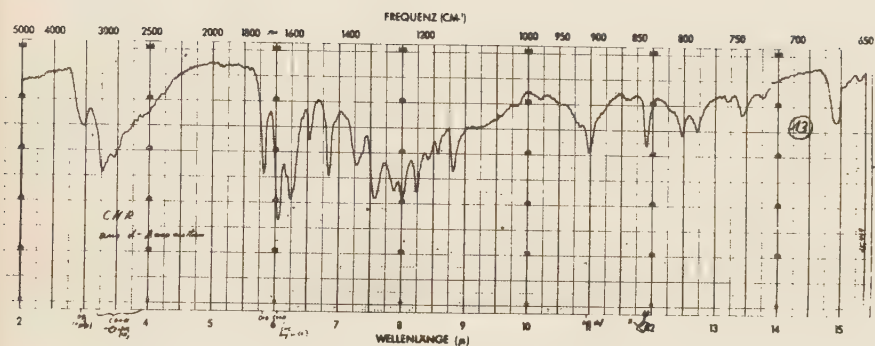


Abb. 13: IR-Spektrum von CHR; 0,55 mg/250 mg KBr

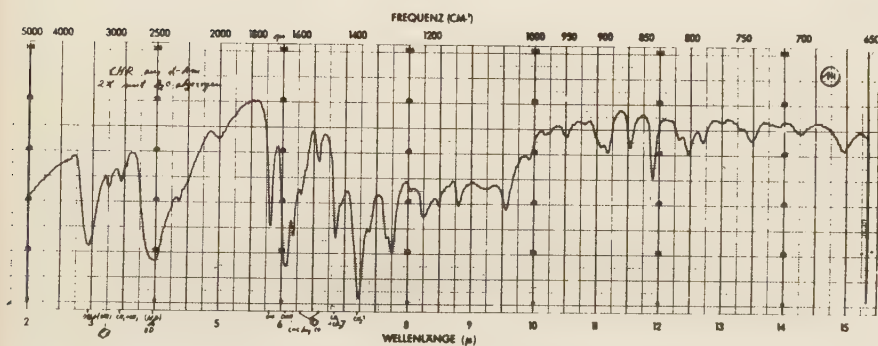
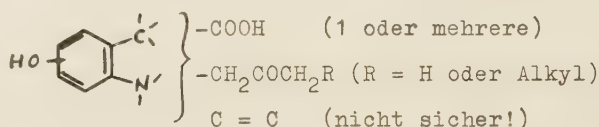


Abb. 14: IR-Spektrum von CHR; 0,55 mg/250 mg KBr
(2 mal mit D₂O abgezogen).

eines ganz normalen Ketons $R-CO-R'$ ($R, R' = \text{Alkyl}$) oder eines Sechsring-Ketons vorhanden.
Schwieriger sind die Banden bei 1650 u. 1620 cm^{-1} zu deuten. Vorläufig sollen sie einer oder mehreren $COOH$ -Gruppen und $C=C$ (konj.) (sehr unsicher!) zugeordnet werden. Bei 1450 und 1385 cm^{-1} finden sich nochmals Anzeichen für CH_2+CH_3 . Für SO_3H (bzw. $-SO_3^-$) lassen sich auch hier keine Banden finden; jedenfalls fehlt der charakteristische Topf bei ca. 1200 cm^{-1} völlig, wie er z.B. in $CysSO_3H$ zu finden ist (Abb. 15, S. 14).

Nach den bisherigen Befunden bietet sich für den Chromophor folgender Strukturvorschlag an:



Nach einer C, H, N -Analyse im Submikromasstabs³⁾ ergibt sich als wahrscheinlichste Formel für CHR: $C_{13}H_{11}NO_7$. Für den hohen Sauerstoffgehalt haben wir vererst noch keine Erklärung.

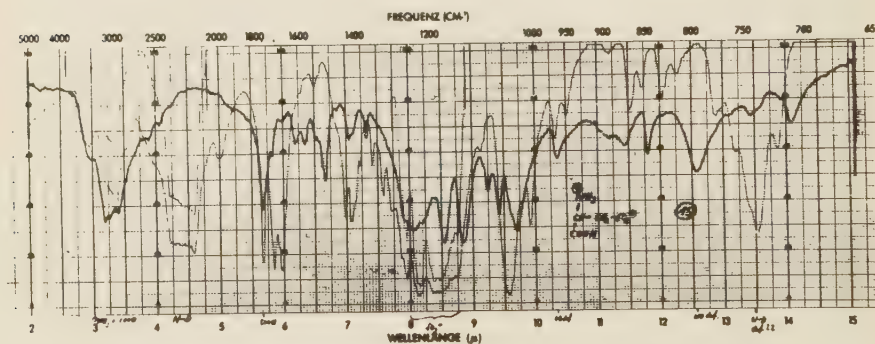


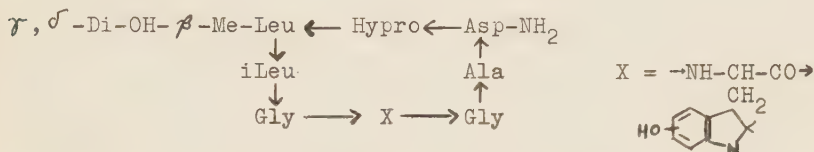
Abb. 15: IR-Spektrum von Cysteinsäure.

³⁾ Mikroanalytlaboratoriet, Uppsala Universitets,
Medicinsk-Kemiska Institution

Diskussion der Ergebnisse und ergänzende Versuche.

Zusammen mit dem Analysenergebnis für den Chromophor CHR, der durch saure Hydrolyse des Amanitins gefunden wurde, lässt sich eine vorläufige C,H,N,O,S-Bilanz für das α -Amanitin aufstellen, die von der früher¹⁾ errechneten erheblich abweicht.

U. Gebert⁴⁾ fand durch Edman-Abbau am Desthio- α -amanitin-Partialhydrolysat folgende, neue Sequenz:



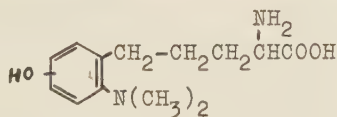
Dem Alanin entspricht im α -Amanitin das "gebundene" Cystein.

Damit ist endlich das aus der Summenformel gefundene, im bisherigen Strukturbild entweder als NH_2 -Gruppe an den Benzolkern gesetzte oder aber ganz unberücksichtigte, überzählige N-Atom im zweiten Glycin untergebracht. Als weitere Tatsache muss jetzt die direkte Verknüpfung von Hydroxyprolin und γ, δ -Dihydroxy- β -methyllleucin hingenommen werden. Der Chromophor des Amanitins scheint nun als Aminosäure zwischen zwei Molekülen Glycin eingebaut zu sein.

Die Bruttoformel für den Amanitinchromophor errechnet sich wie folgt aus dem Analysenergebnis $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_7$ (für CHR).

Da der aromatische Baustein als Aminosäure im Peptidverband vorliegt, muss er mindestens ein N mehr besitzen als der durch Abbau erhaltene (vgl. auch Abb. 11, S. 11). Mehr als 3 O-Atome im Molekül ($\text{OH} + \text{COOH}$) braucht er aber im intakten Amanitin nicht zu enthalten.

Die Anzahl der H-Atome im CHR wurde als Minimum angesehen. Für ein hypothetisches, völlig durchhydriertes, nur den Benzolkern enthaltendes Produkt mit Aminosäureseitenkette, etwa so:



, errechnen sich 20 H.

⁴⁾ Diplomarbeit U. Gebert, Frankfurt/M, 1963

Totalhydrolysats T_4 (Abb. 11, S. 11) zeigt neben dem zur Anode wandernden CHR auch noch Pauly- und Ninhhydrin-positive, kathodisch wandernde Komponenten, die wohl Vorstufen von CHR sind. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass sich unter diesen scharfen Hydrolysebedingungen noch eine oder gar mehrere Aminosäuren peptidisch gebunden am Chromophor befinden. Diese eben besprochenen Komponenten sind mit den von A. Höfer¹⁾ gefundenen "Tryptophan"-Derivaten nicht identisch. Unter unseren sauren Hydrolysebedingungen treten aber noch weitere Nebenprodukte auf. So sehen wir in Abb. 16, S. 18, eine Auftrennung an Sephadex der in den Mutterlaugen von CHR befindlichen, Pauly-positiven Produkte, die nur noch im γ -Mengen-Masstab in der hier gezeigten pherographischen "Reinheit" isoliert werden konnten. Dabei bedeuten P_1 , P_2 , ... nacheinander aus der Säule austretende, im Uvicord sichtbar gemachte Komponenten, von denen jede zur weiteren Reinigung 10 bis 20 mal über die genannte Säule fraktioniert wurde. Weil die Mengen der erhaltenen Produkte viel zu klein waren, um noch IR-Spektren davon aufnehmen zu können, wurden von ihnen zugleich mit CHR Massenspektren aufgenommen.

Massenspektrographische Ergebnisse (nur vorläufige Resultate).

Das schwerste Ion, welches überhaupt gemessen wurde (P_4 in Abb. 16), hat die Masse 249. P_4 besitzt Ähnlichkeit mit CHR, trägt aber noch eine zusätzliche Seitenkette.

Das schwerste Ion aus CHR hat nur die Masse 189; es tritt aber noch ein weiterer intensiver, 45 Masseneinheiten tiefer liegender Peak auf, der dem Decarboxylierungsprodukt der Masse 189 entsprechen muss.

P_2 , P_3 und P_5 konnten aus Substanzmangel nicht gemessen werden; P_6 war zu wenig flüchtig.

P_7 scheint den Massenspektren einer Hydroxyindolincarbon-säure zu entsprechen.

Einschränkend muss gesagt werden, dass im CHR noch nicht die geeignete Substanz für massenspektroskopische Messungen vorliegt, weil sie zu wenig flüchtig zu sein scheint.

Hier werden weitere Versuche mit veräthertem und verestertem CHR folgen müssen. Der so abgewandelte Chromophor wird

5) Für die bisher angefertigten Massenspektrogramme sei Herrn Prof. Dr. K. Heyns und Herrn Dr. H.-Fr. Grützmaker, Hamburg, herzlich gedankt.

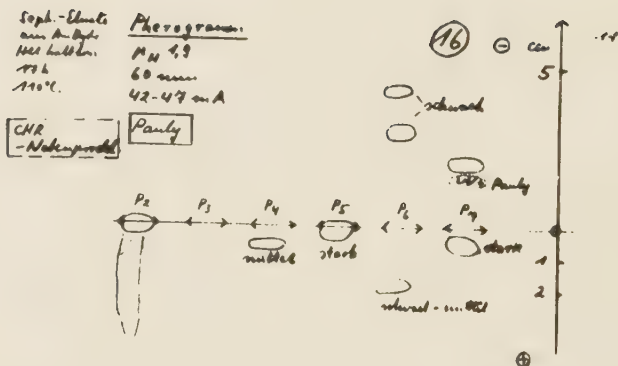


Abb. 16: Pherogramm bei pH 1,9 der CHR-Nebenprodukte aus einem 17-h-Totalhydrolysat von *L*-Amanitin. P₁, P₂ ... sind nacheinander aus einer Sephadex G 25 Medium Säule austretende Fraktionen. Alle Produkte sind Pauly-positiv.

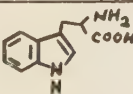
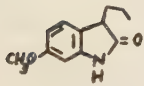
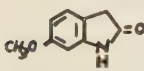
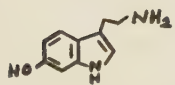
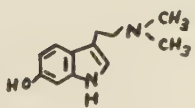
wesentlich flüchtiger sein als der ursprüngliche. Die Gefahr, dass der Chromophor vor der Messung thermisch abgebaut wird, sinkt.

Immerhin sieht man, dass die schwerste gemessene Masse 249 in die selbe Größenordnung kommt wie das durch C,H,N-Analyse "gefundene" Molekulargewicht von CHR (293). Bei P₄ könnte es sich ja schon um ein Decarboxylierungsprodukt von CHR handeln (293 - 44 = 249). Bei CHR selbst wird 189 bestimmt nicht die höchste, denkbare Masse sein, weil es (s.o.) erst bei 280°C. anfängt, sich - ohne zu schmelzen - zu zersetzen.

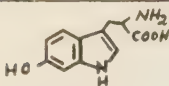
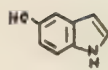
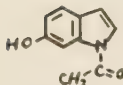
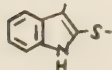
Pauly-Reaktionen verschiedener Indolsysteme und Diskussion von UV-Spektren.

Es sei kurz eine Tabelle der Pauly-Reaktion von verschiedenen Indolderivaten und Amanitin-Abbauprodukten gebracht.

Tabelle I

Produkt	Farbe des Reaktionsproduktes mit Pauly-Reagenz
	-
	-
	kanariengelb
	schwach gelb
	blaurot
	blaurot

Fortsetzung Tabelle I.

Produkt	Farbe des Reaktionsproduktes mit Pauly-Reagenz
	blaurot
	gelbrot
	braunrot
	gelbrot
 (Phd, Phd- Partialhydrolysat)	-
α -Amanitin	rotviolett
"Tryptophan"-Derivat	rot
CHR	gelbrot

Man sieht sofort, dass die von A. Höfer¹⁾ betrachteten 6-Hydroxyindol-Derivate die gemeinsame blaurote Farbreaktion zeigen, die sonst nirgends mehr auftritt. Das unter den früheren¹⁾ Bedingungen erhaltene Hydrolysenprodukt hat ein UV-Spektrum, das bis in die Details dem Spektrum des 6-Hydroxytryptamins gleicht. Wir wollen hier nur das Spektrum von 6-Hydroxytryptamin noch einmal zeigen (Abb. 17, S. 21).⁺⁾ Es zeigt die gleichen Veränderungen beim Stehen in verdünnter NaOH wie das Höfer'sche "Tryptophan"-Derivat. Pherogramme zeigen jedoch, dass die Produkte nicht übereinstimmen. Es muss

⁺⁾ s. Tafel der Chromophore, S. 25a

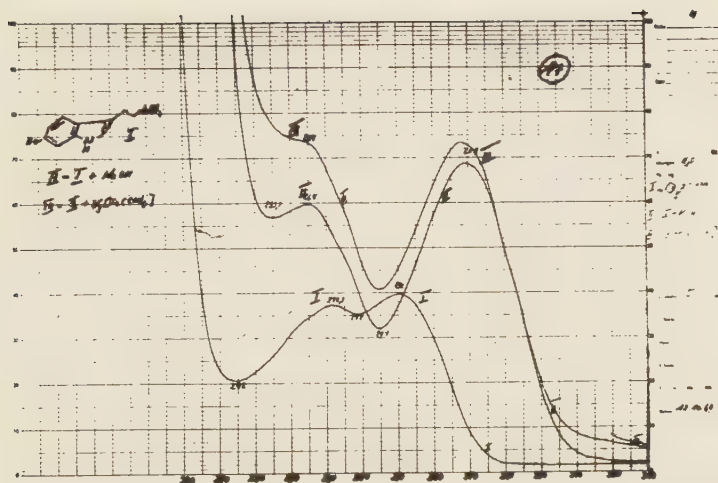
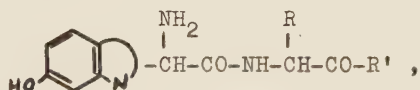


Abb. 17: UV-Spektrum von 6-Hydroxytryptamin; I in H_2O ,
 II = I + NaOH, III = II nach Zusatz von
 $K_3[Fe(CN)_6]$ (auskompensiert) oder nach 3-täg. Stehen.

angenommen werden, dass vielmehr bei dem Höfer'schen
 Tryptophanderivat ein Baustein vorliegt, der folgende
 Teilstruktur hat:



also ein Peptid, was auch durch die relativ schonende
 Hydrolyse wahrscheinlich ist. Jedenfalls ist es auch
 heute noch verfrüht, aus Analogieschlüssen vom Phalloidin
 her und den wenigen vorliegenden UV-Spektren auf ein
 Hydroxyindol-Derivat zu schliessen.

Es seien hier noch - mehr zum Ausschluss von bestimmten
 Strukturen - die UV-Spektren von 6-Hydroxy-N-acetylundolin
 (Abb. 18, S. 22), das im Gebiet von 290 bis 310 $m\mu$ grosse
 Ähnlichkeit mit dem Chromophor im Amanitin aufweist, und von
 N-Acetylundolin (Abb. 19, S. 22) gezeigt.

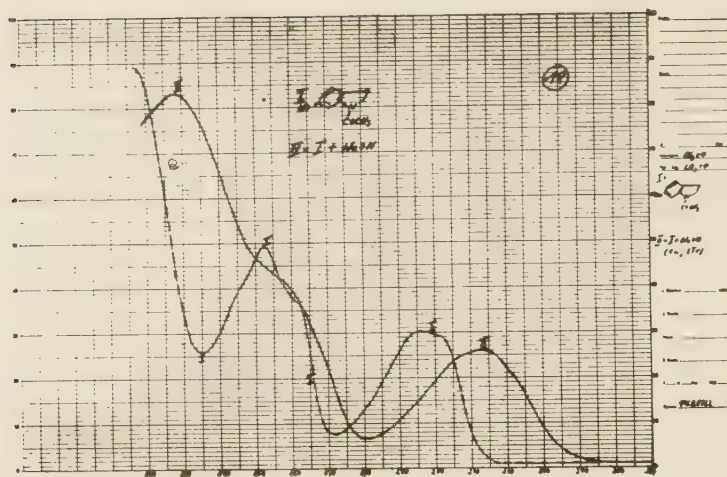


Abb. 18: UV-Spektrum von 6-Hydroxy-N-acetyllindolin
I in CH_3OH ; II = I + NaOH

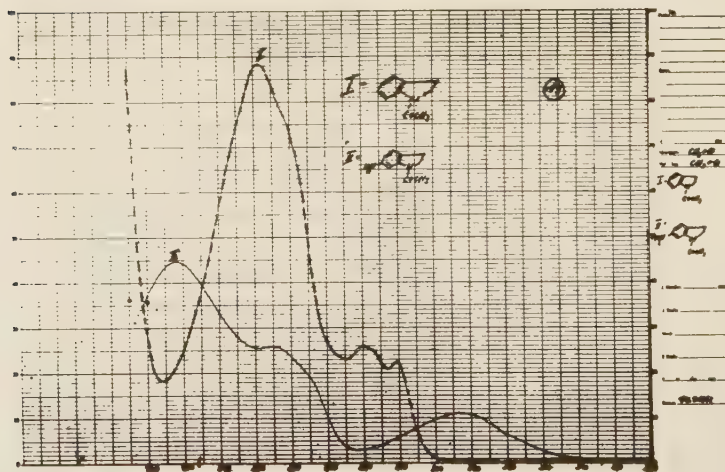


Abb. 19: UV-Spektrum von N-Acetyllindolin (I, in CH_3OH)
[II = 6-Amino-N-Acetyllindolin in CH_3OH]

Die Einführung der OH-Gruppe in 6-Stellung bewirkt eine Verschiebung der längstwelligsten Absorptionsbande um 13 m μ nach längeren Wellen gegenüber dem unsubstituierten Körper; gleichzeitig wird die Feinstruktur der 280-290-m μ -Maxima aufgehoben.

Aus der Tatsache, dass Amanitin selbst mit konzentrierten Säuren kein Indolinium-Spektrum gibt, wie z.B. N-Methyl-indolin-3-acetamid im Gebiet von 250-270 m μ beim Zusatz von Säure (Abb. 20, S. 24), darf noch nicht geschlossen werden, dass sich im Amanitin kein Indolingerüst befindet: Eine OH-Gruppe in 5- oder 6-Stellung lässt im Sauren kein Indolinium-Spektrum auftreten.

Weil noch keine Hydroxyindoline verfügbar sind, sei daher auf das Spektrum von 2-Dimethylamino-p-kresol (Abb. 21, S. 24) als N-methyliertes Pseudo-6-hydroxyindolin verwiesen.

Der Vollständigkeit halber werden hier noch die UV-Spektren des mit Acetanhydrid/Pyridin acetylierten Chromophors (CHR) (Abb. 22, S. 25) und seines Umsetzungsproduktes mit verd. NaOH, sowie - nach beendeter Spaltung - das mit HCl angesäuerte Reaktionsprodukt (Abb. 23, S. 24) gezeigt.

Abb. 23 zeigt grosse Ähnlichkeit mit CHR vor der Acetylierung (Abb. 9, S. 9); der acylierte Körper (1 in Abb. 22) hat jedoch keinerlei Ähnlichkeit mit dem Amanitinspektrum.

Es war ja auch von vornherein zu erwarten, dass bei der sauren Totalhydrolyse des Amanitinchromophors grössere Veränderungen als nur etwa die Abspaltung einer Acylgruppe vom Indolinstickstoff auftreten würden.

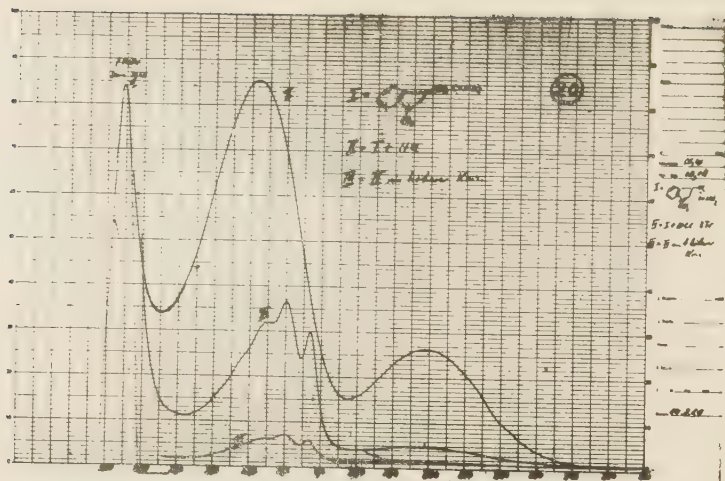


Abb. 20: UV-Spektrum von N-Methylindolin-3-acetamid
I in CH_3OH ; II = I + HCl; III = II in höherer Konz.

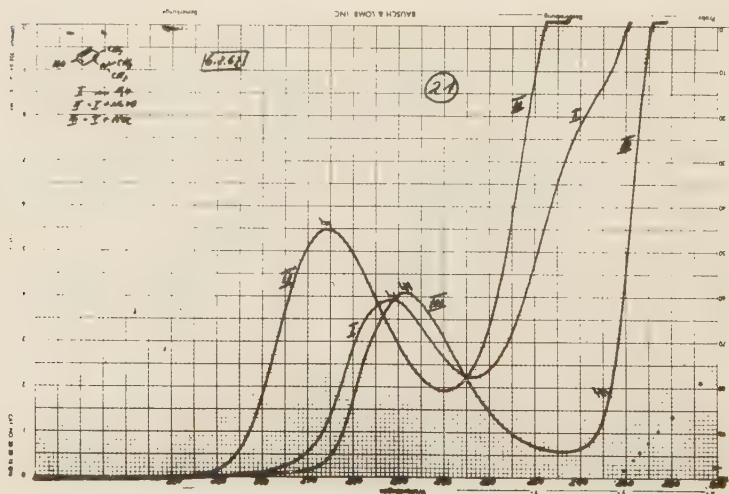


Abb. 21: UV-Spektrum von 2-Dimethylamino-p-kresol I in CH_3OH ;
II = I + NaOH; III = I + HCl

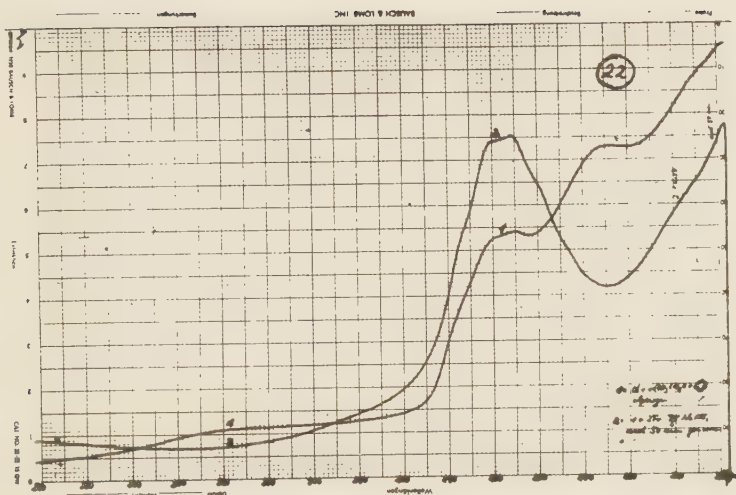


Abb. 22: UV-Spektrum des mit Acetanhydrid/Pyridin acetylierten Chromophors CHR; 1 in H_2O ; 2 = 1 + 3 Tr. n/5 NaOH, nach 50 min gemessen.

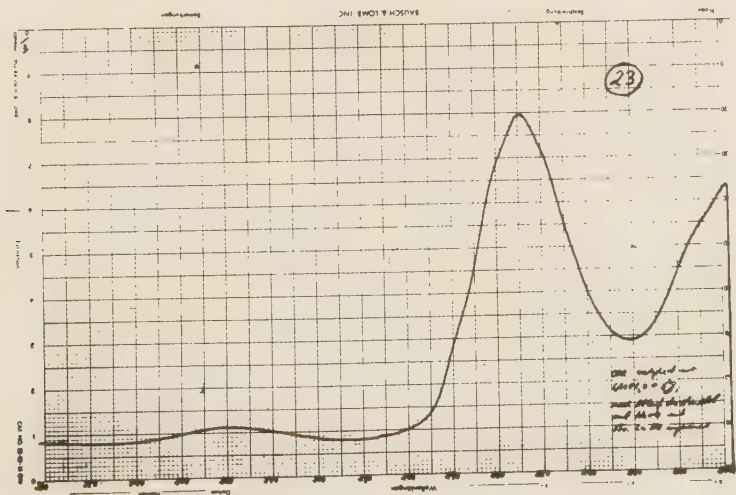


Abb. 23: UV-Spektrum des acetylierten CHR aus Abb. 22, nach Ablauf der Spaltung durch NaOH mit HCl angesäuert.

Zur Frage der Schwefelbindung.

Auch bei diesen Untersuchungen ist es nicht geglückt, die Bindung des Schwefels am Chromophor des Amanitins aufzuklären. Bei der sauren Hydrolyse treten Cysteinsäure und geringe Mengen Cystin und Alanin auf. Abb. 24, S. 27 zeigt noch einmal ein Pherochrom des sauren Totalhydrolysates, in dem diese 3 Komponenten deutlich zu sehen sind.

Während bei der sauren Hydrolyse im geschlossenen Röhrchen (aber ohne Ausschluss von Sauerstoff) immer viel Cysteinsäure gefunden wurde, konnte dieselbe beim alkalischen Abbau (60 Minuten bei 100°C. mit halbkonz. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung) nie aufgefunden werden.

Wird Cystein selbst der "sauren Totalhydrolyse" bei den Bedingungen der Amanitinhydrolyse unterworfen, treten weder Alanin, Glycin, Serin noch CysSO_3H auf; einzig ein schwacher Fleck (auf der Anodenseite), der Cysteinsulfinsäure zugeordnet wird (Abb. 25, S. 28; 1), spricht für schwache Oxydation des Cysteins über die Disulfidstufe hinaus.

Bei der sauren Hydrolyse eines Gemisches von Cysteinmethylester und Cystindimethylester (Abb. 26, S. 29) treten zwar CysSO_2H und CysSO_3H auf, aber kein Alanin und kein Glycin. Die letzteren sind auch bei der Hydrolyse von S-Methylcystein nicht zu finden; ein Beweis, dass im Amanitin eine Bindung

NH...

$\text{R-S-CH}_2\text{-CH-CO...}$ (R = Alkyl) nicht vorliegt.

Die saure Hydrolyse unter Ausschluss von Sauerstoff unterdrückt die Bildung von CysSO_3H (Abb. 24 a, S. 28). Die Menge Cystein, die hier im Aminosäureanalysator gefunden wird, ist aber im Vergleich zu den anderen Aminosäuren viel zu gering. Ein Teil des Cysteins muss daher während der Abspaltung verändert werden.

Bekannt ist die Abspaltung von H_2S aus Cystein und die Bildung von α -Aminoacrylsäure, die zu Brenztraubensäure weiter reagiert⁶⁾ (H_2S konnte in den sauren Hydrolysaten nur durch den Geruch, in den alkalischen nach dem Ansäuern ebenso festgestellt werden).

6) T.S. Tarbell, D.P. Harnish; Chem. Rev. 49 (1951); 2 ff.

Tafel der UV-Chromophore

Substanz	Nr.	Medium	$\lambda_{\max}$ in $m\mu$			
Phalloidin	1a,b	H ⁺ , OH ⁻ [210]		290	(283, 298)	
α -Amanitin	2a	H ⁺	(240)		301-309	
	2b	OH ⁻	{260}		330	
Chromophor aus						
α -Amanitin nach	3a	H ⁺	263		305 340	370
Umwandlung mit	3b	OH ⁻		280	325	380
NaOH						
Chromophore aus						
2n HCl-Hydrolyse	4a	H ⁺	263		(338)	
Chromophor CHR	5a	H ⁺	212 248	318		370
	5b	OH ⁻	218 259			380
CHR nach Acety-						
lierung	6a	H ₂ O	255 260			370
6a nach 50 min						
in NaOH	6b	OH ⁻	235 258	320		
6b nach Ansäuern						
mit HCl	6c	H ⁺	255	320		370
Höfersches						
"Tryptophan"-						
Derivat	7a	H ⁺	270 290			
	7b	OH ⁻	264	309		
6-Hydroxy-						
tryptamin	8a	H ⁺	270 290			
	8b	OH ⁻	264	309		
Chromophor aus						
Methyl- α -amani-						
tin nach Uwandl.						
mit NaOH	9a	H ⁺	270 290			
	9b	OH ⁻	270 290			
Desthio- α -ama-						
nitin (nach der						
Reinigung über						
sephadex)	10a	H ₂ O	270 290			
	10b	OH ⁻	264	309		

Zahlen in () sind Schultern; Zahlen in [] nur ungefähre Lage;
Bande von 4a, 338 $m\mu$ mit sehr stark wechselnder Intensität,
nur Mittelwert der Lage. -

Identisch sind die Chromophore 7a, 8a, 9a, 9b, 10a.

Identisch sind die Chromophore 7b, 8b. 10b.

Ähnlich sind sich 3a, 4a einerseits und
5a, 6c andererseits.

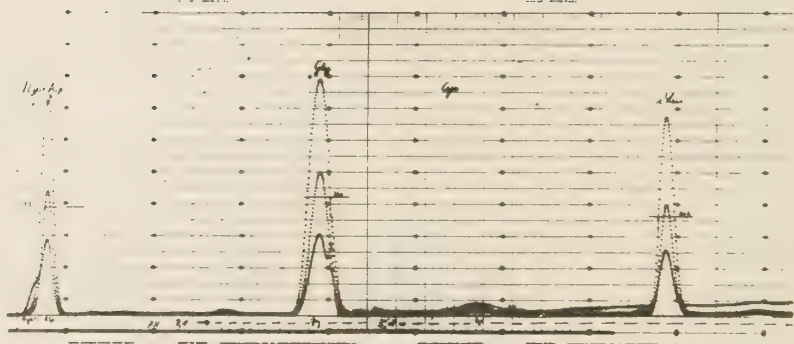


Abb. 24 a: Amanitin-Totalhydrolysat (halbkonz. HCl, 110°)
 Aminosäureanalysator (Bender & Hobein, Apparatur
 nach Hañig); Schreiber: Honeywell-Komp.-Schreiber
 Asp:Gly:Cys:Ileu wie 1,06:1,82:0,4:1,12

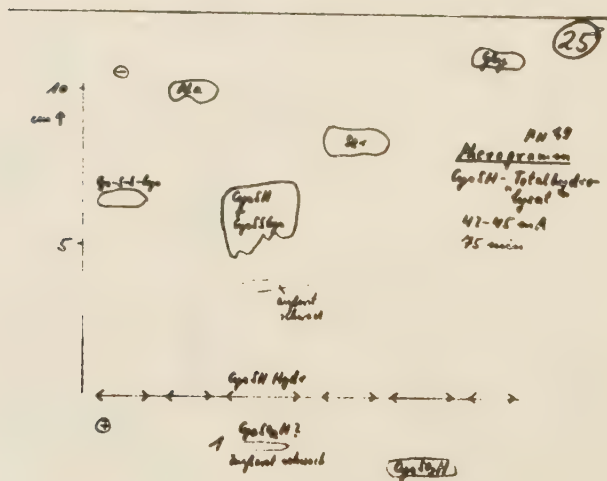


Abb. 25: Pherogramm pH 1,9 von Cystein-"Totalhydrolysat"
 (CysSH Hydr).

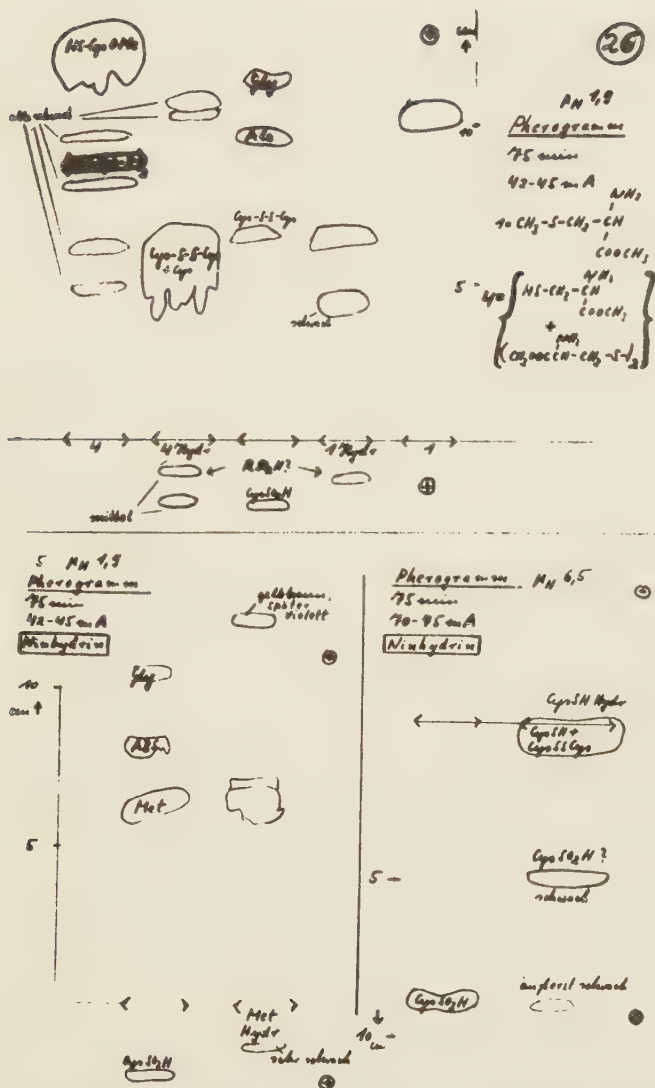


Abb. 26: Pherogramme bei pH 1,9 von S-Methylcystein-, (Cysteinmethyl- und Cystindimethylester)- und Methionin-"Totalhydrolysat"; bei pH 6,5 von CysSH Hydr.

Auch die Alaninbildung kann man deuten. Aus der Brenztraubensäure und dem in der Lösung vorhandenen NH_4^+ (z.B. aus Asp-NH_2) würde α -Ketiminopropionsäure entstehen und diese dann durch weitere Brenztraubensäure zu Alanin reduziert werden^{7,8)}.

Nicht gedeutet werden kann bis jetzt:

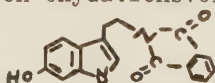
- 1) Die Bildung des gleichen Chromophors (identisch mit der UV-Absorption des Höferschen Tryptophanderivates) durch
 - a) kurzzeitige Hydrolyse von α -Amanitin oder Methyl- α -amanitin mit verd. H_2SO_4
 - b) Umwandlung von Methyl- α -amanitin mit verd. NaOH (analog S. 1, aber ohne Verschiebung der Maxima ins Langwellige direkter Übergang in den Höferschen Chromophor; s.a. Tafel der Chromophore, S. 25 a)
- 2) Die Bildung eines neuen Chromophors (Abb. 2, S. 2) durch Umwandlung von α -Amanitin oder Desthio- α -amanitin⁹⁾ mit verd. NaOH .
- 3) Die Bildung eines neuen Chromophors CHR (Abb. 9, S. 9) durch salzsaure Totalhydrolyse über das bei 1a) erwähnte Zwischenprodukt.

Man kann annehmen, dass die Abspaltung des Schwefels mit der Umlagerung selbst nichts zu tun hat. Zweifellos ist der Chromophor, ob mit oder ohne anhaftenden Schwefel, nicht stabil gegen OH^- oder H^+ .

Vielleicht gelingt es, durch geeignete Hydrierungsmethoden (vollständige Hydrierung des Aromaten unter Eliminierung der OH-Gruppe) einen einheitlichen, gegen saure und alkalische Hydrolyse stabilen "Chromophor" zu erzeugen.

Oxydationsversuche am Amanitin mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$ führten zur vollständigen Zerstörung des Chromophorgerüsts; die UV-Absorption verschwindet. Es gelingt nicht, durch Bildung eines Sulfoxydes oder Sulfons das Vorliegen einer einfachen C-S-C-Verknüpfung nachzuweisen.

Es gelang auch nicht, durch Oxydationsversuche an 6-Hydroxy-N-phthalyl-tryptamin

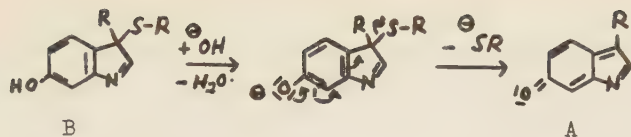


die Bildung eines Körpers folgender Struktur (A)

7) V. du Vigneaud et al.; J. Biol. Chem. 131 (1939); 273

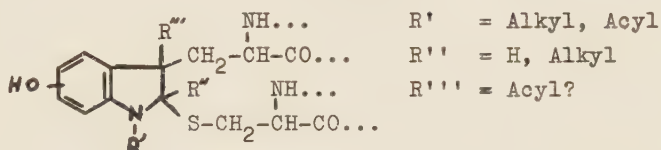
8) Dipl.-Arbeit G. Schabacker, Ffm., 1961

9) Durch inzwischen⁴⁾ ausgeführte Sephadex-Fraktionierung wurde



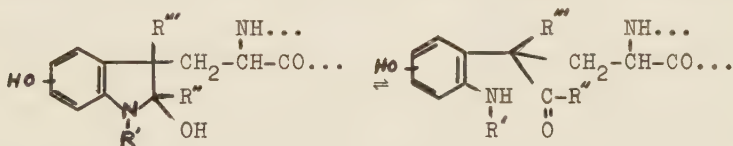
wie er aus dem Amanitinchromophor (B) durch alkalische Spaltung entstehen könnte, zu beweisen.

Auch die Struktur eines 5- oder 6-Hydroxy-N-acyl- (oder -N-alkyl-) indolins mit dem Schwefel in 2-Stellung birgt noch viele Widersprüche:



Die Abspaltung des Schwefels würde die von der Cysteinseite vertrauten Abbauprodukte (Cys, CysS-SCys, CysSO₃H, Ala) ergeben; auch die ausserordentliche Leichtigkeit, mit der die Abspaltung erfolgt, wäre erklärt. In C-2 haben wir den Kohlenstoff eines N,S-Ketals vor uns. Es ist bekannt ⁶⁾, dass in solchen Verbindungstypen sehr leicht Spaltung der C-N und C-S-Bindung mit Alkalien (schon 0,2 n Na₂CO₃) oder Säuren stattfindet.

Wenn wir das erste Spaltstück aus der Hydrolyse noch formulieren wollen, könnten wir folgende Struktur annehmen:



Diese Betrachtungen haben natürlich rein spekulativen Charakter. Die weitere Umwandlung in der sauren Hydrolyse zum Chromophor CHR ist noch völlig unklar.

Festgestellt, dass Desthio- α -amanitin aus 3 Komponenten - eine davon ohne OH-Gruppe am Benzolkern - besteht.

KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE.

Alle NMR-Spektren wurden mit dem Varian A 60 Kernresonanz-Spektrographen aufgenommen. Alle Angaben in Hz sind feld-abwärts vom Tetramethylsilan-Signal (TMS) = 0 Hz gerechnet.

Als geeignete Lösungsmittel für Amanitin fanden sich nur Dimethylsulfoxyd (DMS) -bzw. Perdeuterodimethylsulfoxyd (per-D-DMS) - und H_2O (bzw. D_2O). In $0,9\text{ cm}^3$ DMS lösen sich 300 mg Amanitin zu einer stark viskosen Lösung, die sich allmählich gelb färbt. In Wasser lösen sich 6%.

Wir vergleichen zunächst α -Amanitin (α -Am), getrocknet, in per-D-DMS (Abb. 27, S. 33) mit α -Am, nach Austausch mit D_2O getrocknet, in per-D-DMS (Abb. 28, S. 33), miteinander. In Abb. 28 fehlen die beiden 1-Protonen-Singletts bei 692 ① und 564 Hz ②. Durch Vergleich mit den NMR-Spektren des α -Methylamanitins (MeAm) (Abb. 29, S. 34) und des Phalloidins (Phd) (Abb. 30, S. 34), bei denen ② fehlt, kann man diesen Peak dem phenolischen OH in 5- oder 6-Stellung am Chromophorgerüst (vgl. auch S. 36) zuordnen. Der Peak ① kann noch nicht zugeordnet werden. Durch Austauschversuche mit D_2O und Vergleich mit Phd, bei dem der Peak ebenfalls vorhanden ist, kann lediglich auf ein leicht austauschbares H an N, vielleicht eines Amid-H, geschlossen werden. Vergleicht man allerdings die Strukturen von Am und Phd miteinander, so gibt es überhaupt keine Amidbindung mehr, die beiden Naturstoffen gemeinsam ist. Im β -Amanitin (β -Am) fällt das H am COOH der Asparaginsäure in den gleichen Frequenzbereich wie Peak ①; wir erhalten ein breites, etwas verwaschenes Signal von 2 einzelnen Protonen. In Abb. 31, S. 35 sind nochmals einige Austauschversuche nebeneinander gestellt. Nur getrocknetes α -Am hat Peaks ① und ②, sowie das breite, verwaschene N-H-Gebiet A, während α -Am in D_2O (B) wegen des raschen Austauschs mit den Deuteronen des Wassers die aromatischen Protonen (s. auch S. 36) ohne den Untergrund der Amid-H zeigt. In mit D_2O abgezogenem α -Am (obere Kurve) sind ① und ② nahezu verschwunden.

Die Stellung des phenolischen OH am Chromophorgerüst.

In Abb. 31 B (S. 35) sind die aromatischen Protonen mit Peaks bei 410, 420, 458 und 467 Hz herausgezeichnet. In einem aromatischen

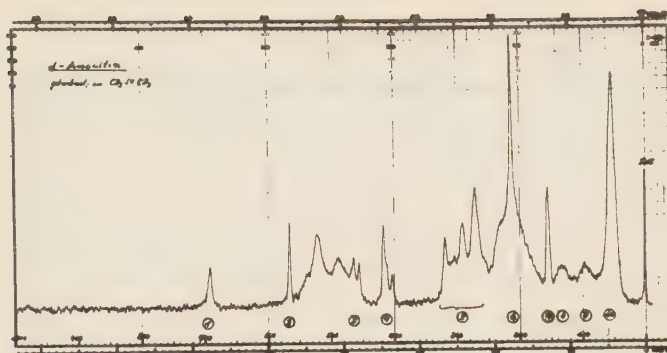


Abb. 27: NMR-Spektrum von α -Amanitin, getrocknet, in per-D-DMS.

[Filter 0,4; R.F. 0,16; S.T. 500; S.W. 1000; Sp.A. 32]

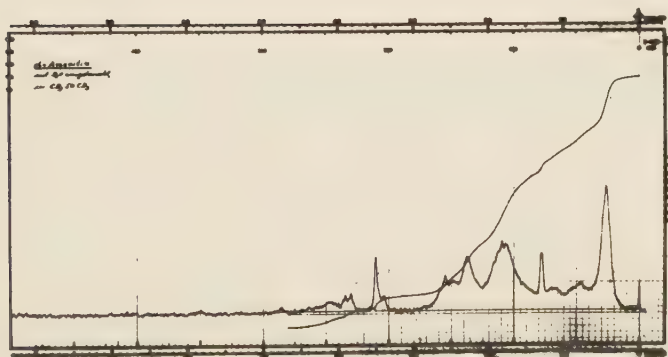


Abb. 28: NMR-Spektrum von α -Amanitin, mit D_2O ausgetauscht, in per-D-DMS.

[Filter 0,4; R.F. 0,16; S.T. 500; S.W. 1000; Sp.A. 10; Int. A. 16/5]

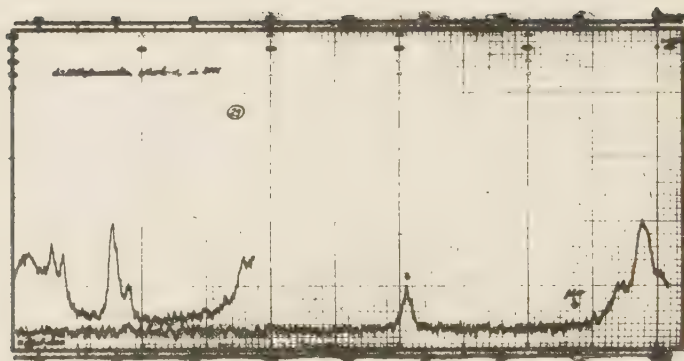


Abb. 29: NMR-Spektrum von α -Methylamanitin, getrocknet, in DMS.

[Filter 0,4; R.F. 0,16; S.T. 500; S.W. 500;
S.O. 0,0 u. +500; Sp.A. 32]



Abb. 30: NMR-Spektrum von Phalloidin, mit D_2O ausgetauscht, in per-DMS.

[Filter 0,4; R.F. 0,18; S.T. 500; S.W. 1000;
S.O. 0,0; Sp.A. 16; Int.A. 32/5]

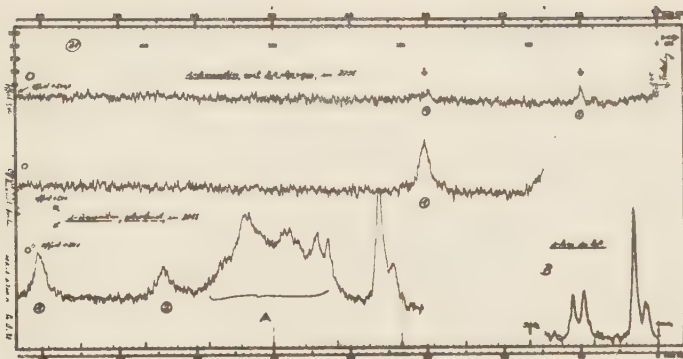


Abb. 31: NMR-Spektren von α -Am, mit D_2O abgezogen, in DMS;
 α -Am, getrocknet, in DMS; α -Am in H_2O .
[Filter 0,4; R.F. 0,16; S.T. 500; S.O. (s.c.);
Sp.A. 32]

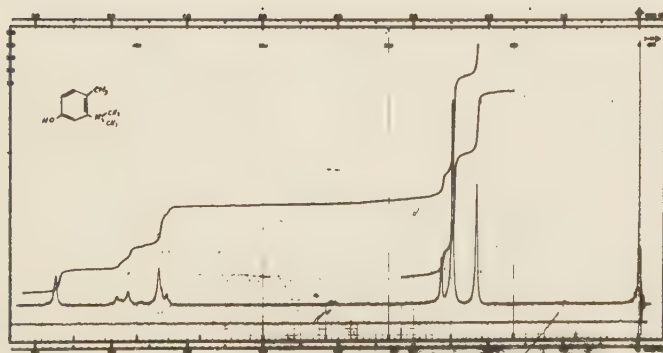
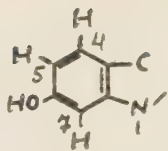
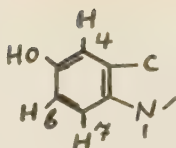


Abb. 32: NMR-Spektrum von 2-Dimethylamino-p-kresol in CCl_4 .
[Filter 4,0; R.F. 0,04; S.T. 500; S.W. 500; S.O.
0,0; Sp.A. 0,8; Int.A. 50/0,25]

System



oder



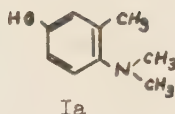
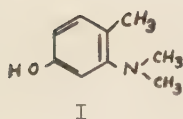
vom Typ ABC werden Aufspaltungen beobachtet, die mit diesem Peak-Muster übereinstimmen. Jeweils die benachbarten Protonen 4 und 5 (bzw. 6 und 7) spalten durch Kopplung mit den Nachbarn zu Dubletts auf, während das einzelne Proton 7 (bzw. 4) nur geringe Aufspaltung zeigen darf (meta- oder 1,3-Kopplung). Die beobachteten Kopplungskonstanten von 8,5 Hz für ortho-Kopplung stimmen mit den Angaben aus Tabellen über Spinkopplungskonstanten in aromatischen Systemen überein¹⁾. Das einzelne Proton fällt mit dem zweiten Peak bei 420 Hz des mehr abgeschirmten Protons, also 4 (bzw. 6) zusammen. Wir bekommen daher das Bild zweier voneinander getrennter 1-Protonen-Dubletts, von denen eines mit einem 1-Protonensinglett überlagert ist. Die Flächen der Peaks 410, 420 und 458, 467 Hz müssen sich daher verhalten wie 2:1. Das ist in der Tat der Fall.

Da nur 3 aromatische und keine olefinischen Protonen im Spektrum des Amanitins zu finden sind und diese in der oben angegebenen Weise aufspalten, kann es sich beim Amanitin wie beim Phalloidin nicht um ein Indol als Grundkörper handeln, in dem 2- oder 3-Stellung unbesetzt sind. Aus anderen Versuchen (s. SS. 19 , 47) ist die Struktur eines Indols jedoch sehr unwahrscheinlich geworden, sodass die Struktur eines Indolins oder N-acylierten Indolins mehr Bedeutung erlangt.

Versuch der Zuordnung zur Stellung des phenolischen OH.

Um die Stellung des phenolischen OH festzulegen, müssen geeignete 1,2,4-trisubstituierte Benzole gemessen und die Muster der 3 Aromaten-H mit dem des Amanitins verglichen werden. Als einfachste Körper bieten sich 1-Methyl-2-dimethylamino-4-hydroxybenzol und das entsprechende 5-Hydroxy-Isomere an:

¹⁾ People, Schneider und Berstein; High resolution Nuclear Magnetic resonance; McGraw Hill Book Company, 1959



Ia ist nur unter grössten Schwierigkeiten darzustellen (Literaturpräparat Schomann); es gelang lediglich, die entsprechenden Methylläther von I und Ia, stark angereichert mit dem jeweiligen Isomeren zu erhalten, sodass deren Spektren hier nicht wiedergegeben werden.

Das Spektrum von I (Abb. 32, S. 35) zeigt von 376-420 Hz das erwartete ABC-Muster (Beweis für Abb. 31 B), von links nach rechts in Richtung zunehmenden Feldes: OH (465 Hz), ? H₅ (366, 357 Hz), H₃ (382 Hz), ? H₆ (383, 376 Hz); N(CH₃)₂ (158, 149 Hz), CH₃ (130 Hz).

Wie man sofort aus der Aufspaltung des N(CH₃)₂-Peaks sieht, ist auch I nicht frei von Isomeren. Solch eine Gruppierung müsste nämlich ein 6-Protonen-Singlett geben. Aus dem Flächenverhältnis von 4:15 der beiden Peaks kann man entnehmen, dass I etwa zu 25% mit einem Isomeren verunreinigt ist. Da mit dem entsprechenden 5-Hydroxy-Körper Ia nicht verglichen werden kann; müssen die Zuordnungen für H₅ und H₆ noch mit Fragezeichen versehen werden.

Weiterhin wurden die in Tabelle II (S. 43) aufgeführten Indolinkörper verglichen. Den Anstoss zum Vergleich der Indoline gab das UV-Spektrum des von O. Unger ²⁾ dargestellten 6-Methoxy-N-acetylintolins, das bisher die grösste Ähnlichkeit mit dem intakten Amanitinchromophor aufwies.

Gegenüber VIII (Abb. 33, S. 38) sind im N-Acetylintolin VI (Abb. 34, S. 38) die aromatischen Protonen feldabwärts verschoben. H₇ hat einen zusätzlichen shift feldabwärts erlitten und spaltet mit seinen Nachbarn (ABCD-System) zu einem Multiplett auf.

Durch Einführung einer Nitrogruppe in die fraglichen 5- und 6-Stellungen bei Indolinen und N-Acetylintolinen ist es möglich, deren Position durch Analyse von NMR-Spektren eindeutig festzulegen.

2) Dissertation O. Unger, Frankfurt/M; 1962

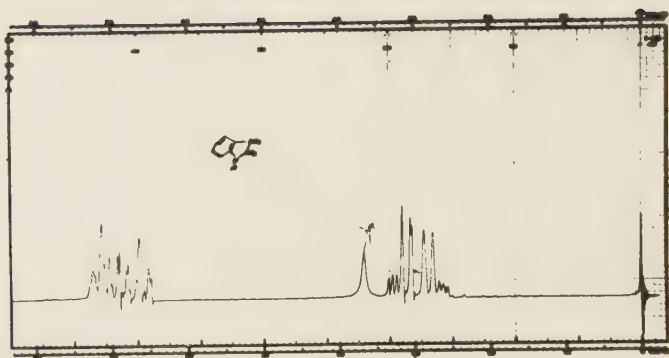


Abb. 33: NMR-Spektrum von Indolin (flüssig, rein), VIII.
[Filter 4,0; R.F. 0,1; S.T. 250; S.W. 500; S.O. 0,0;
Sp.A. 0,4]

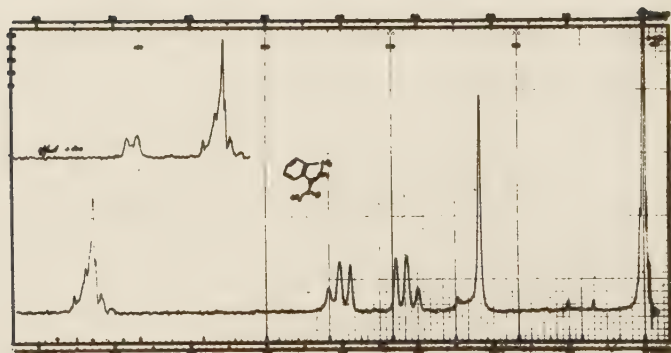


Abb. 34: NMR-Spektrum von N-Acetylindolin in CDCl₃, VI.
[Filter 2,0; R.F. 0,10; S.T. 250; S.W. 500;
S.O. 0,0 u. +100,0; Sp.A. 3,2]

Die NO_2 -Gruppe übt auf die benachbarten Protonen ein starkes "desshielding" aus, d.h., die diamagnetische Abschirmung wird verringert; es tritt ein shift nach der Richtung des kleineren Feldes auf.

Während IV (Abb. 35, S. 40) ein schlecht aufgelöstes 3-Protonen-Multiplett besitzt, zeigt V (Abb. 36, S. 40) sehr schön die Dubletts von H_4 und H_5 . Jeder Peak des H_5 -Dubletts ist durch meta-Kopplung mit H_7 nochmals aufgespalten, so dass wir für H_5 ein Quartett erhalten. Die Aufspaltung von H_7 ($J_{5,7}$ wäre etwa 3 Hz) ist nur angedeutet; wir finden ein breites Signal von der Fläche 1.

H_7 ist durch die Nachbarschaft von NO_2 - und CH_3CO -Gruppe besonders stark "desshielded".

Bei den Nitroindolininen II und III (Abb. 37, 38, S. 40) finden wir ähnliche Verhältnisse. In II erfährt H_4 einen starken shift feldabwärts. Sein Singlett fällt mit einem Peak des Dubletts von H_6 zusammen. Beide Nachbarn der NO_2 -Gruppe erfahren hier etwa den gleichen shift. Das ist verständlich, da sie ja in nicht sehr verschiedener Umgebung stehen. H_7 zeigt das geringste desshielding, findet sich also am weitesten feldaufwärts als Dublett ($J_{7,6} = 9$ Hz).

In III sind nun H_5 und H_7 die Nachbarn der NO_2 -Gruppe; bei diesen werden wir shifts feldabwärts zu erwarten haben. H_5 zeigt **wieder** die bekannte Quartett-Struktur, H_4 ist ein Dublett, und zwischen beiden findet sich das durch ~~meta~~ meta-Kopplung mit H_5 schwach aufgespaltene H_7 . Wir sehen also, dass bei der Nitro-Gruppe in den betrachteten 4 Fällen jeweils eine eindeutige Zuordnung ihrer Stellung (ob 5- oder 6-Position) möglich ist.

Die OH-Gruppe übt ein viel geringeres desshielding auf die Nachbarprotonen aus. Hydroxy-N-acetylindoline und die desacetylierten Körper sind sehr schwer darzustellen. Bisher wurde nur das 6-Hydroxy-N-acetylindolin (VII) (Abb. 39, S. 42)³⁾

³⁾ Dissertation D. Grimm und Diplomarbeit D. Rempel, Frankfurt/M.

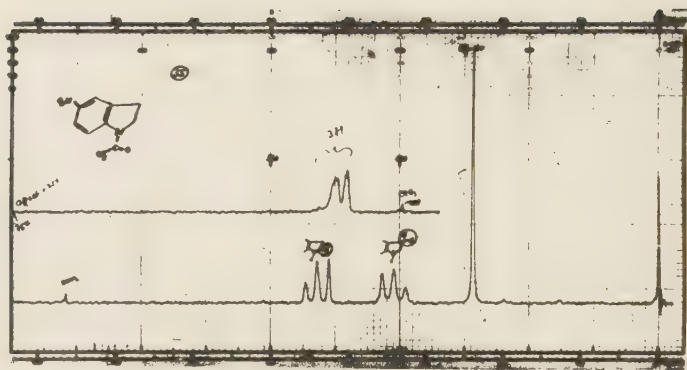


Abb. 35: NMR-Spektrum von 5-Nitro-N-acetylindolin IV in CDCl_3 .
[Filter 1,0; R.F. 0,12; S.T. 250; S.W. 500;
S.O. 0,0; (+250); Sp.A. 4,0]

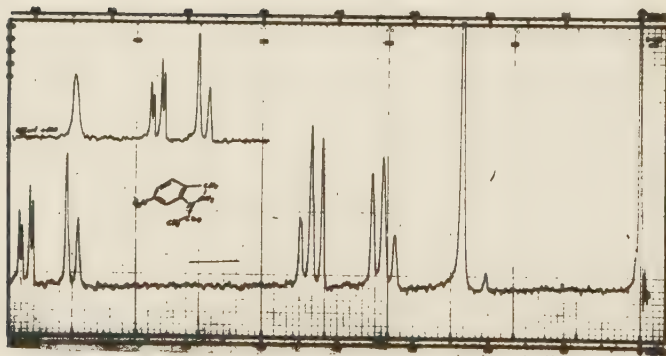


Abb. 36: NMR-Spektrum von 6-Nitro-N-acetylindolin V in CDCl_3 .
[Filter 1,0; R.F. 0,2; S.T. 250; S.W. 500;
S.O. 0,0 u. +100,0; Sp.A. 16 u. 12,5]

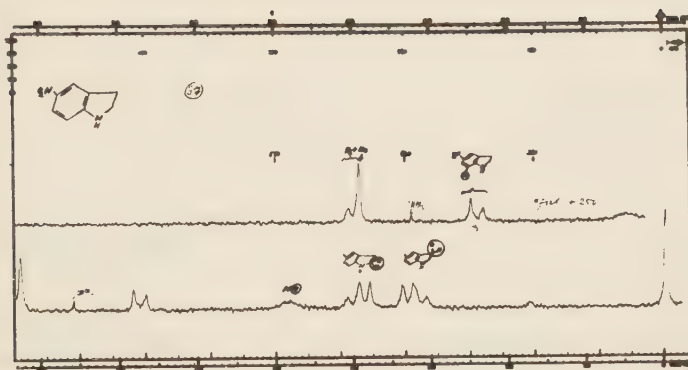


Abb. 37: NMR-Spektrum von 5-Nitroindolin II in CDCl₃.
[Filter 2,0; R.F. 0,16; S.T. 250; S.W. 500;
S.O. 0,0 u. +250; Sp.A. 6,3]

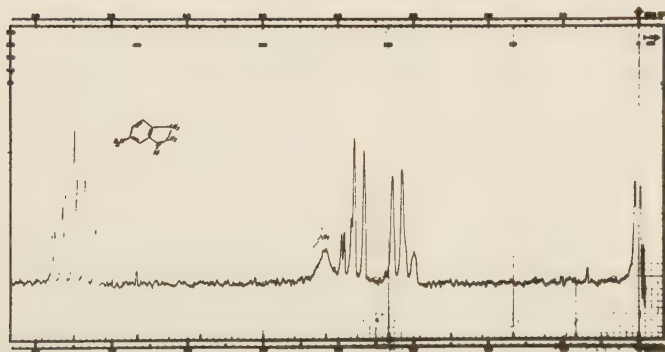


Abb. 38: NMR-Spektrum von 6-Nitroindolin III in CDCl₃.
[Filter 1,0; R.F. 0,2; S.T. 250; S.W. 500;
S.O. 0,0; Sp.A. 16,0]

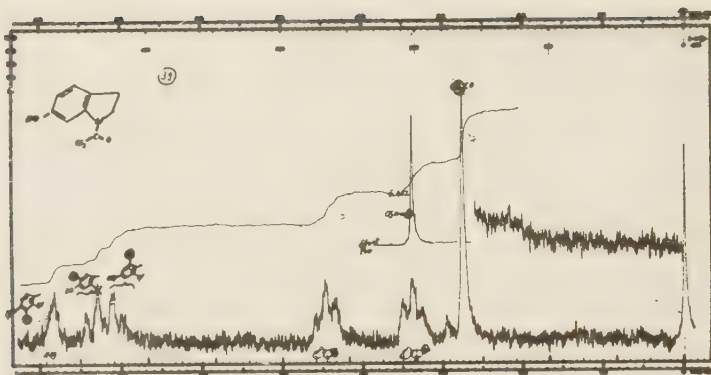


Abb. 39: NMR-Spektrum von 6-Hydroxy-N-acetyllindolin VII
in CF_3COOH .
[Filter 1,0; R.F. 0,12; S.T. 500; S.W. 500;
S.O. 0,0; Sp.A. 25]

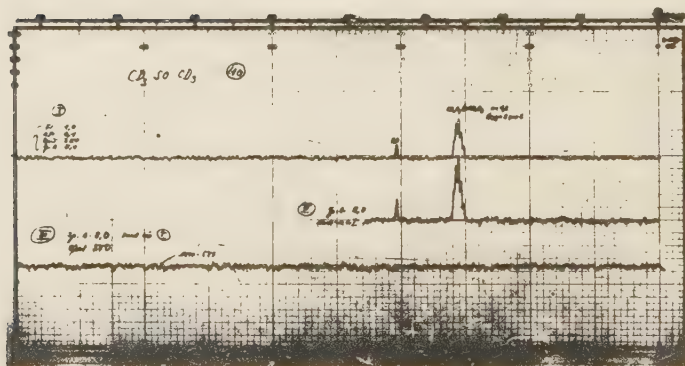


Abb. 40: NMR-Spektrum von Perdeuteriodimethylsulfoxyd
(flüssig, rein), Merck Canada Lab. No. 62 CDO 61.
[S.T. 250; S.W. 500; S.O. 0; 500]

Tabelle II
Frequenzlagen der aromatischen Protonen

Nr.	Formel	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇	(Hz)
VIII		← 387 - 438 (M) →				
VI		← 422 - 453 (M) →		500 - 510 (M)		
IV		← - 500 - 522 (M) →				
V		445 } D 454 }		Q { 482, 484 } { 488, 491 }		- 545 (S)
II		496 (S)	-	496 } D 504 }	400 } D 409 }	
III		448 } D 450 }		Q { 457, 459 } { 466, 468 }		- 433 } D 441 }
VII		417 } D 425 }		437 } D 445 }		- 469 (S)

Δ-Am

← 410, 420 (D) 420 (S) 458, 467 (D) →

S = Singlett, D = Dublett, Q = Quartett, M = Multiplett

erhalten.

VII zeigt das Singlett von H_7 noch deutlich getrennt feldabwärts von den beiden Dubletts für H_5 und H_4 . Demnach ist jetzt schon ein Vergleich mit α -Amanitin möglich.

Man sieht, dass die 5-OH-Gruppierung wahrscheinlicher ist als die Stellung der OH-Gruppe in Position 6.

Durch die Nachbarschaft von OH und COCH_3 wird H_7 immerhin noch so stark deshielded, dass es nicht mehr mit H_4 und H_5 zusammenfällt. Es kann jetzt schon vorausgesagt werden, dass das Singlett von H_4 bei dem entsprechenden 5-Hydroxy-N-acetylintolin weiter feldaufwärts liegen muss, etwa im selben Frequenzbereich wie H_6 .

Zusammenfassend stellen wir fest, dass die OH-Gruppe am Chromophorsystem des Amanitins eher in der 5-Position stehen muss, wenn es sich um ein Indolinsystem handelt.

Die Wasserstoffbilanz.

Man kann in einem Kernresonanzspektrum die Flächen unter den Peaks mittels eines im Gerät eingebauten Integrators oder direkt durch Planimetrie bestimmen. Tut man das für das ganze Spektrum und hat einen geeigneten inneren Standard, d.h. eine Fläche, von der man genau weiss, dass sie 1 oder 2 oder ... H entspricht, so kann man auf diese Weise den Gesamt-H-Gehalt einer Verbindung bestimmen.

Bei hohen Substanzkonzentrationen relativ einfacher Verbindungen und daher geringen Verstärkungsgraden (kleinen Spektrum- und Integralamplituden) bekommt man ausgezeichnete Ergebnisse. Bei geringen Substanzmengen oder Substanzen mit hohem Molekulargewicht sind die Resultate nicht mehr so zuverlässig.

Bei der Berechnung des Gesamt-H müssen die Rest-H des Lösungsmittels abgezogen werden. Perdeuterodimethylsulfoxyd gibt ein Multiplett bei 150 - 160 Hz und ein Singlett bei 205 Hz. Das Multiplett setzt sich zusammen aus Singletts von Molekülen $\text{CD}_2\text{HSOCD}_2\text{H}$, $\text{CDH}_2\text{SOCD}_2\text{H}$ usw.; das Singlett zeigt H_2O an. Dimethylsulfoxyd ist sehr hygroskopisch; bei quantitativen Messungen muss das Verhältnis der Flächen

(Multipllett : Singlett) immer wieder neu bestimmt werden.

In unserem Falle ist es 4:1. (Abb. 40, S. 42).

Wir betrachten α -Amanitin, getrocknet, in per-D-DMS

(Abb. 27, S. 33). Bei der Summierung der Flächen unter der Kurve fallen Peak ⑦ bei 155 Hz und 25% der Fläche von Peak ⑦ (!) aus Peak ⑥ (215 Hz) weg.

Es wurden gefunden für:

<u>α-Amanitin, getrocknet,</u>	Gesamtfläche	169,2
<u>in per-D-DMS</u>	Fläche 4 = 2 H	5,0
	Anzahl der H	$169,2 : 2,5 = \underline{\underline{68}}$

Grössere Fehler stellen sich ein, wenn man mit D₂O ausgetauschtes α -Amanitin (Abb. 28, S. 33) auf seinen H-Gehalt untersucht.

<u>Austauschbare H:</u>	4 OH -Gruppen
	7 NH -Gruppen
	1 NH ₂ -Gruppe

Summe = 13 H

Diese Summe stellt eine Mindestanzahl dar. Es steht noch offen, ob sich am Chromophorgerüst noch aktives, austauschbares H befindet.

Aus den Rest-Absorptionen von Peak ① und Peak ② geht hervor, dass 28,5% der austauschbaren H trotz mehrfachen Abziehens des mit D₂O versetzten Amanitins im Vakuum nicht gegen D gewechselt wurden. Das verwendete D₂O war 99,7%ig.

Es wurden gefunden für:

<u>α-Amanitin, mit D₂O aus-</u>	Gesamt-Integrationsstrecke	18,8 cm
<u>getauscht, in per-D-DMS</u>	Standard wie bei obigem	
	Beispiel	<u>1 H = 0,55 cm</u>
	Gesamt-H -2 H	
	(Peaks ① und ② wurden	
	nicht mitintegriert)	<u>= 32 H</u>
	-28,5% von 11 H	<u>= 28 H</u>
		<u>===</u>

Wir finden für:

Phalloidin, mit D₂O aus-
getauscht, in per-D-DMS

Gesamtfläche

(- nichtausgetauschte H) 66,2
4 Aromaten-H (420-500 Hz) 9,6

Gesamt-H - 1 H (= 30%

von 4 OH) = 27 H

Phalloidin hat die Formel C₃₅H₄₈O₁₀N₈S,
mit D₂O ausgetauschtes also C₃₅H₃₇D₁₁O₁₀N₈S.

Wenn wir unterstellen, dass wir bei der Messung der Gesamt-H bei mit D₂O ausgetauschtem Amanitin und Phalloidin den gleichen prozentualen Fehler gemacht haben, müssten wir im ausgetauschten Amanitin finden

$$\frac{37}{27} = \frac{x}{28} \quad x = \underline{38 \text{ H}}$$

Zählen wir die 13 ausgetauschten H und die 4 H, die noch im getrockneten α -Amanitin als 2 H₂O (Peptidwasser) gebunden waren, hinzu, so kommen wir auf einen Betrag von 55 H. Der Fehler beträgt also 13 H.

PYROLYSE UND GASCHROMATOGRAPHIE.

Beim Erhitzen von Phalloidin bis zur Zersetzung kann man durch Auffangen der gasförmigen Pyrolyseprodukte in einem mit Methanol getränkten Wattebausch nach der Elution mit Methanol einwandfrei den Indolchromophor im UV-Spektrum nachweisen. Auch die Zn-Staub-Destillation führte zum selben Ergebnis. Ebenso gibt H-Hypro-Ala-Try-Leu-Ala-D-Threo-OMe¹⁾

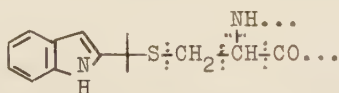


nach der Pyrolyse einwandfrei das Indol-Spektrum.

Bei der pyrolytischen Zersetzung (mit oder ohne Zn) von Amanitin entsteht auch nicht die Spur von Indol. Auch andere Chromophore (Indoline, Aniline) sind nicht nachzuweisen. Es sieht so aus, als würde das Chromophorsystem des Amanitins durch Pyrolyse vollständig zerstört.

Durch orientierende Versuche an einem geeigneten Gaschromatographen sollten daher die schwefelhaltigen Pyrolyseprodukte von Am, Phd und Heptapeptidthioäther untersucht werden, um auf diese Weise Anhaltspunkte über die Bindung des S am Chromophorsystem zu gewinnen.

Wenn Phd zersetzt wird, sollten aus dem Cysteinbruchstück verschiedene Mercaptane und H₂S entstehen, wenn das Molekül an den mit | und ... bezeichneten Stellen gespalten worden ist:



Ebenso sollte sich der Heptapeptidthioäther verhalten. Die bei Am auftretenden, schwefelhaltigen Bruchstücke sollten dann, wegen der andersartigen Schwefelbindung, nicht die gleichen sein wie bei Phd und Heptapeptidthioäther.

Der verwendete Gaschromatograph²⁾ hatte als Detektorzelle einen Flammenionisationsdetektor mit 10⁻¹¹ A Grundstrom und eine Siliconelastomer-Kapillarsäule von ca. 60 m Länge.

Als Trägergas wurde ein H₂/N₂-Gemisch verwendet.

1) Ein freundlicherweise von Herrn Dr. O. Zipp, Frankfurt/M, überlassenes Präparat.

2) Die gaschromatographischen Messungen wurden von Herrn Dipl.-Chem. E. Heine durchgeführt.

Durch Versuche mit C_3 - und C_4 -Mercaptanen, Thioglykol und Thiophenol wurde festgestellt, dass all diese Substanzen wegen des Einlass-Systems aus Kupfer (chemische Bindung!) den Gaschromatographen nicht wieder verlassen. Disulfide (z.B. Dimethyldisulfid) passieren Einlass-System und Kolonne ohne weiteres (s. Abb. 42, S. 51).

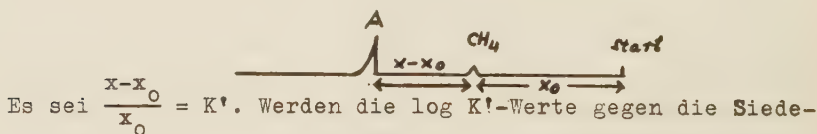
Nicht durchgelassen werden weiterhin Carbonsäuren und Phenole.

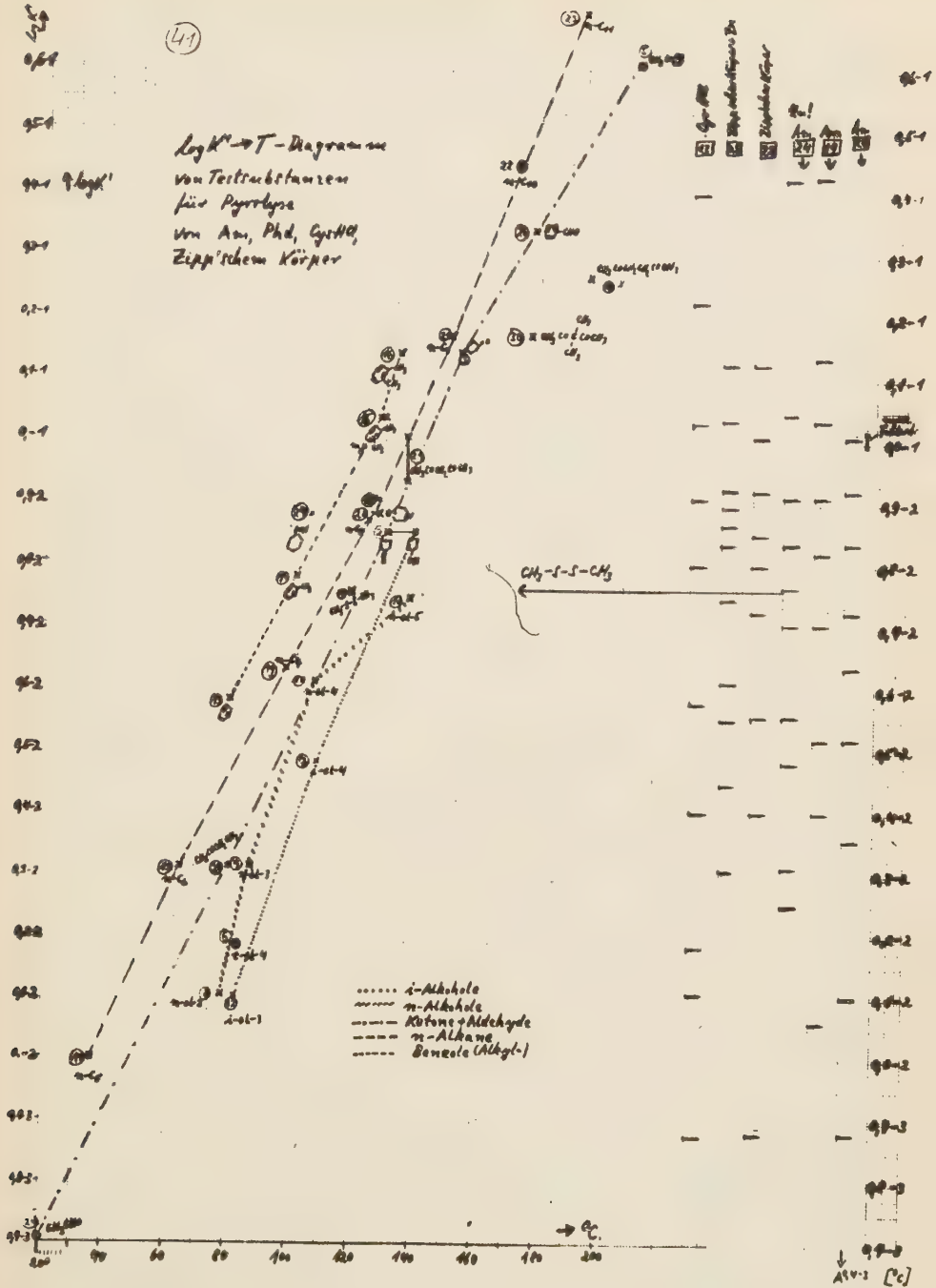
Von verschiedenen Substanzklassen, n-Alkanen, Ketonen, Alkylaromaten, Alkoholen und Aldehyden, sowie Dimethyldisulfid wurden nun die Retentionszeiten bei $100^\circ C$. bestimmt und in ein $\log K'$ -T-Diagramm (Abb. 41, S. 49) eingetragen. Die aufgefundenen Punkte im Diagramm wurden mit den entsprechenden Peaks der Gaschromatogramme von Am, Phd, Cys.HCl und Heptapeptidthioäther (nach der Pyrolyse) verglichen.

Die im Glühröhrchen erzeugten Pyrolyseprodukte der oben genannten Körper wurden mit einer Mikroliter-Spritze während ihrer Bildung aus dem Gasraum abgesaugt und sofort in den Gaschromatographen eingespritzt. Die erhaltenen Chromatogramme zeigen Abb. 43 bis 50, SS. 52 bis 55.

Wir betrachten zunächst das oben erwähnte $\log K'$ -T-Diagramm. Bringt man eine Substanz A (z.B. Toluol) mit etwas CH_4 zusammen in den Gaschromatographen ein, so wird nach einer gewissen Zeit am Schreiber der peak von CH_4 erscheinen; eine bestimmte Zeit später tritt dann auch der Peak von A auf. Diese Retentionszeit hängt im wesentlichen vom Siedepunkt, den Eigenschaften der Kolonne und den Adsorptionseigenschaften der Substanz ab.

Man definiert nun die auf dem Schreiber bis zum Auftreten des CH_4 -Peaks gemessene Strecke als x_0 , die Strecke vom CH_4 -Peak bis zum Peak A als $x-x_0$:





temperaturen T einer homologen Reihe (z. B. der n-Alkane) aufgetragen, dann erhält man eine Gerade.

Man sieht in Abb. 41, S. 49, dass diese Beziehung sehr gut für die Alkane, homologen Benzole, Ketone + Aldehyde und für die iso-Alkohole, weniger gut für die n-Alkohole erfüllt ist.

Die Retentionszeiten der pyrolysierten Körper wurden rechts als Striche aufgetragen; man muss sie sich über die ganze Breite der X-Achse fortgesetzt denken, weil ja die Siedepunkte und die auftretenden Substanzen gar nicht bekannt sind. Um die einzelnen Peaks bestimmten Substanzen zuzuordnen, müssten sehr viele in Frage kommende Gase und Flüssigkeiten geprüft werden. Fällt eine solche Substanz mit einem Peak im Gaschromatogramm der Pyrolyseprodukte zusammen, muss das Chromatogramm nochmals mit einer anderen Säulenpackung wiederholt werden. Fallen dann die betrachteten Peaks immer noch zusammen, ist das Auftreten dieser Substanz unter den Pyrolyseprodukten gesichert.

Bei mit Zn-Staub vermischtem Amanitin (Abb. 46, S. 53) tritt nach der Pyrolyse ein Peak auf, der in allen anderen Diagrammen nicht enthalten ist (Schulter F von Peak E). Seine Lage stimmt genau mit der von $\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$ überein.

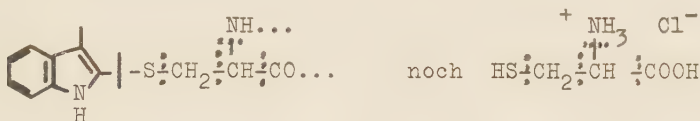
Die folgenden Schlüsse, die daraus gezogen werden, dürfen nur als Anhaltspunkte für spätere, genauere Untersuchungen dienen. Die angewandte Methode der Pyrolyse im offenen Röhrchen gibt zwar reproduzierbare Diagramme, was Anzahl und Lage der Peaks betrifft; die Peakhöhe variiert aber innerhalb gewisser Grenzen von Versuch zu Versuch. Es ist nicht zu erwarten, dass beim blossen Erhitzen "Von Hand" immer genau gleiche Mengen jedes Pyrolyseproduktes entstehen werden. Auch deren Aufziehen in der Spritze kann nie genau reproduzierbar ausgeführt werden.

Für die endgültige Diskussion müssten daher Pyrolysen an Pt-Drähten im Trägergasstrom des Gaschromatographen mit genau eingehaltener Pyrolyse-Temperatur und -Zeit mit den zu vergleichenden Substanzen an zwei verschiedenen Kolonnen gemacht werden. Nur so³⁾ erhält man, auch was die Mengen-

3) J. Janák, Identification of organic substances by the gas chromatographic analysis of their pyrolysis products; Third Gas Chromatographic Symposium, Edinburgh, 1960.

verhältnisse der Pyrolyseprodukte betrifft, ausgezeichnete Resultate.

Wir kehren nun zu dem mit Zn pyrolysierten Amanitin zurück. Weder die Gruppierung

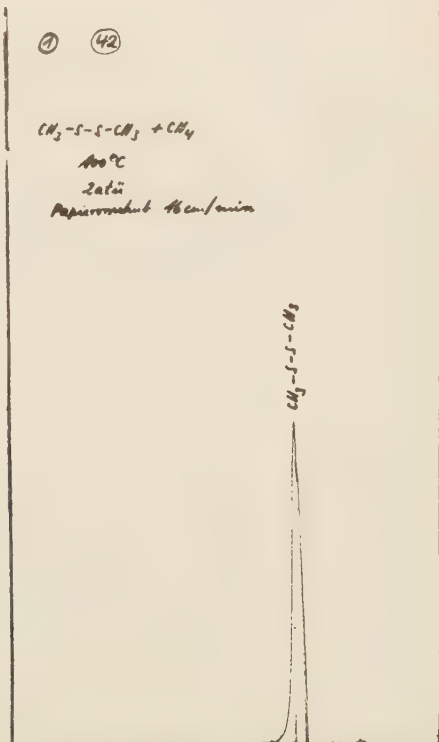


geben nachweisbare **Mengen** von $\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$, gleichgültig, ob die Pyrolyse mit oder ohne Zn erfolgte.

Auch Am ohne Zn gibt kein Dimethyldisulfid. Da aber die Bindung des Schwefels am Cysteinteil zweifelsfrei gesichert ist (Auftreten von CysSO_3H und CysS-S-Cys in den Totalhydrolysaten), kann die im $\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$ auftretende Bindung nur einer -C-S- Bindung aus dem Chromophorteil des Systems entstammen, die erst durch die reduzierende Wirkung des Zn freigelegt wird. Dies ist aber, wie gesagt, eine Arbeitshypothese. Der Beweis muss **erst** durch genauere Versuche erbracht werden!

Abb. 42:

Gaschromatogramm eines Gemisches von CH_4 und Dimethyldisulfid.



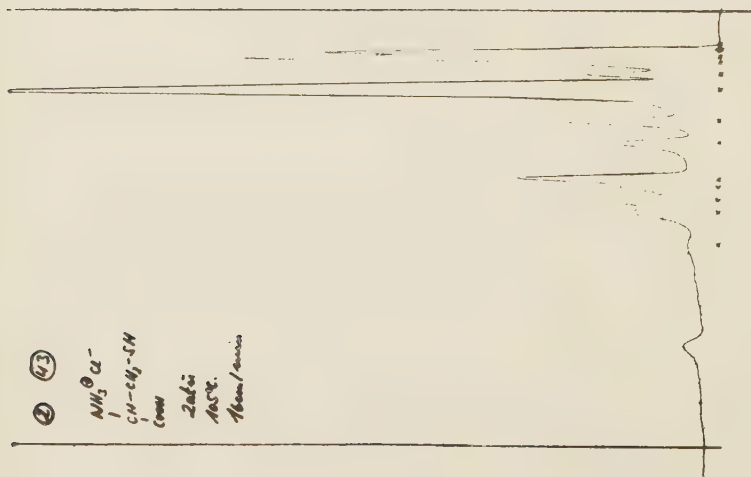


Abb. 43: Gaschromatogramm der Cystein-Pyrolyse

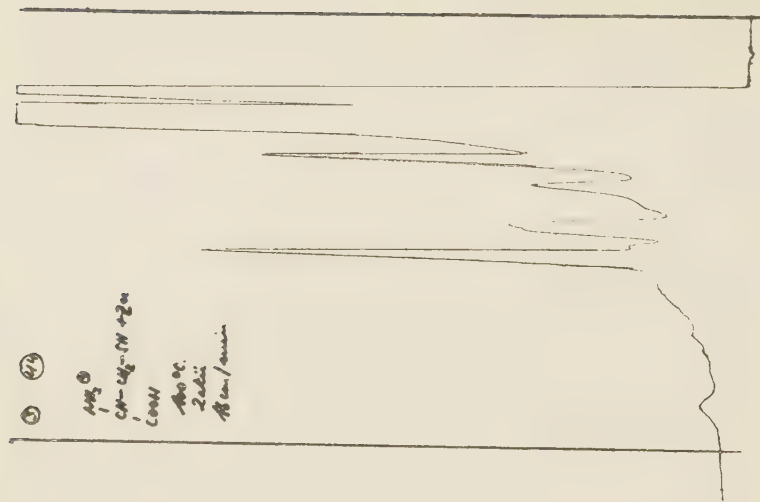


Abb. 44: Gaschromatogramm der Cystein-Pyrolyse (Cys·HCl + Zn-Staub)

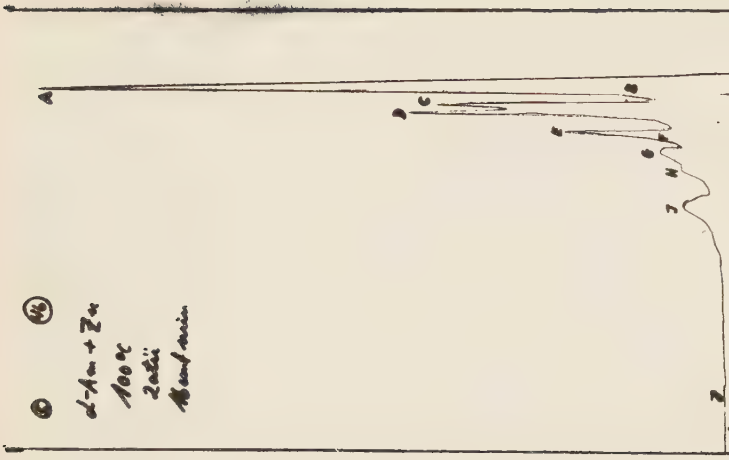


Abb. 46: Gaschromatogramm der Pyrolyse
von α -Amanitin in Ggw. von Zn

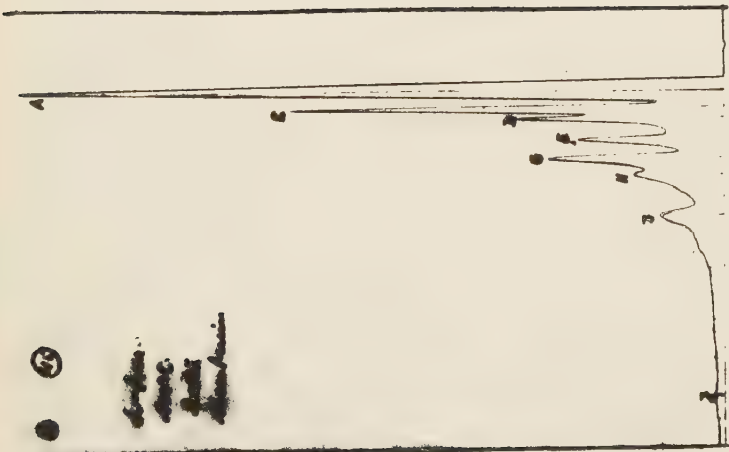


Abb. 45: Gaschromatogramm der Pyrolyse
von α -Amanitin

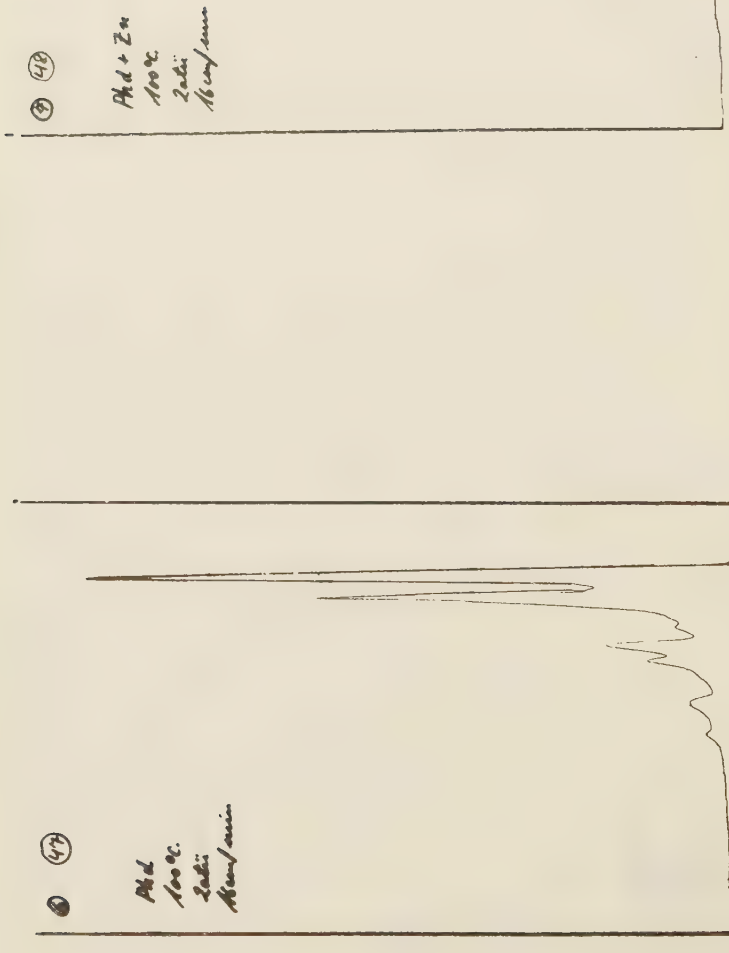


Abb. 47: Gaschromatogramm der Pyrolyse
von Phalloidin

Abb. 48: Gaschromatogramm der Pyrolyse
von Phalloidin in Ggw. von Zn

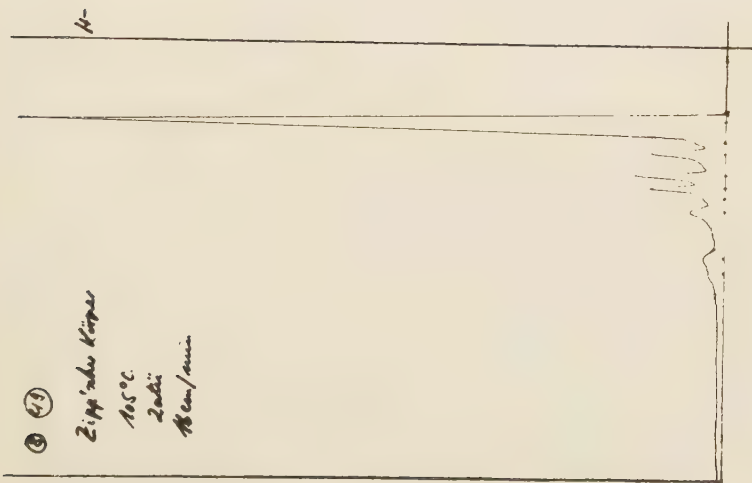


Abb. 49: Gaschromatogramm der Pyrolyse
des Heptapeptithioäthers

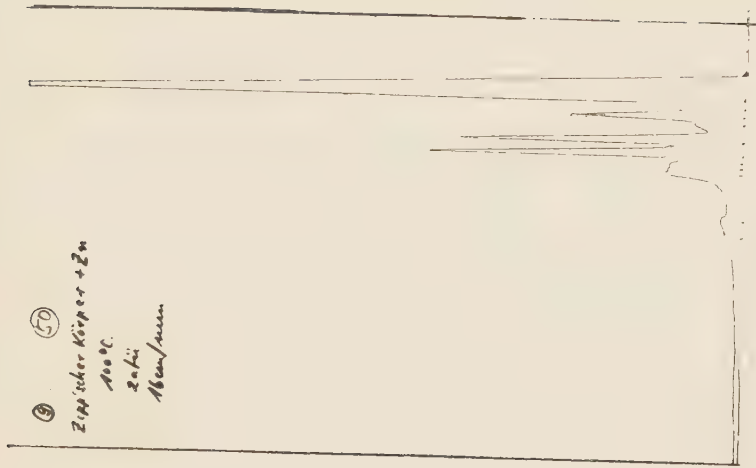


Abb. 50: Gaschromatogramm der Pyrolyse
des Heptapeptidithioäthers + Zn

ZUSAMMENFASSUNG

Durch saure Totalhydrolyse von α -Amanitin konnte ein Chromophor CHR genannter Baustein isoliert werden, dem die Summenformel $C_{13}H_{11}NO_7$ zukommt.

Durch Kernresonanzmessungen wurde die Stellung der OH-Gruppe im intakten α -Amanitin in 4- oder 7-Stellung eines Indolsystems ausgeschlossen und die 5-Stellung in einem Indolinsystem wahrscheinlich gemacht.

Die Summenformel des getrockneten α -Amanitins kann nun $C_{42}H_{59-68}N_{10}O_{15-19}S$ geschrieben werden. Diese Formel

stützt sich auf kernresonanzspektrometrische Wasserstoff-Gehaltsbestimmungen, Sequenzbestimmungen am Aminosäuregerüst des Desthio- α -amanitins und auf die Analyse des Chromophors.

Stellung und Art der Bindung des Schwefels im α -Amanitin konnten noch nicht ermittelt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Hilfsmittel bei Elektrophorese und Chromatographie.

Papier:

Schleicher & Schüll 2043 a mgl

Schleicher & Schüll 2043 b mgl

Puffer:

pH 1,9: 150 μ l Eisessig, 50 ml Ameisensäure, 800 ml H₂O

pH 6,5: 100 ml Pyridin, 10 ml Eisessig, 890 ml H₂O

Lösungsmittel H: 750 ml sec. Butanol, 150 ml Ameisensäure,
100 ml H₂O

Sprühreagentien:

Ninhydrin: 1 g Ninhydrin, 600 ml Methanol, 350 ml
Butanol, 30 ml 2 n Essigsäure

Fluorescein: gesättigte methanolische Lösung

Pauly-Reag.: 1 Mikrospatelspitze Sulfanilsäure (siaz.)
auf 10 ml 10% Soda-Lösung

Beschreibung der Versuche.

Totalhydrolyse von α -Amanitin:

Die im Text angegebenen Mengen α -Amanitin wurden in starkwandigen Glasampullen zusammen mit 2 bis 3 ml azeotrop destillierender HCl übergossen, abgeschmolzen und mit den angegebenen Zeiten (meist 16,5 Stunden) im Trockenschrank bei 110°C. erhitzt. Die nach 30 Minuten tief dunkelblaugrün gefärbten Lösungen wurden nach 1 Stunde schmutzigbraun. Nach dem Erkalten wurde die dunkelbraune Lösung abgesaugt, der Rückstand mehrmals mit kaltem, dann mit kochendem Wasser extrahiert und verworfen (Kohle!). Die vereinigten Filtrate (dunkelbraune bis gelbe Lösungen) wurden im Eindampfschälchen über H₂SO₄ und KOH zur Trockene gebracht (Exsiccator) und der

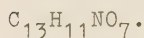
nunmehr dunkelbraune Rückstand in wenig heissem Wasser gelöst.

Sephadex-Reinigung der Hydrolysenprodukte.

Obige, heisse Lösung der Hydrolysenansätze wurde auf eine ca. 60 cm lange Sephadex-G-25-Medium-Säule von 19 mm Durchmesser gegeben und mit Wasser absteigend eluiert. Es wurden 3-ml-Fraktionen von Nr. 18 an (Aminosäuren) aufgefangen, gemäss den Peaks der UV-Absorption am Uvicord (etwa ab Nr. 30) vereinigt und nach dem Eindampfen im Rotationsverdampfer wie oben zur Trockene gebracht.

Aus den Rückständen der ersten beiden UV-positiven Fraktions-schnitte kristallisierte nach einer Woche in gelben, warzenförmigen Kristallen der Chromophor CHR genannte Stoff aus. Dieser wurde mehrmals im Zentrifugengläschen gewaschen und aus sehr wenig heissem Wasser umkristallisiert. Ausbeute aus 1 g Amanitin: 3 mg CHR, Fp.(Zers.) $> 280^{\circ}\text{C}$.

Submikroanalyse mit 238 γ Substanz: 61,68% C, 3,57% H, 4,75% N. Daraus errechnet sich als wahrscheinlichste Formel:



Die noch gelben Mutterlaugen wurden einer 5-stufigen Craig-Verteilung unterworfen. Phasen waren wassergesättigtes Butanol und butanolgesättigtes Wasser in 6-ml-Reagenzgläsern. Die Verteilung von CHR, CHR-Nebenprodukten (ButChrom) und Aminosäuren (AS) ergab sich wie folgt:

		Phasen-Wanderungs- richtung	Gläschen
Phase	Butanol	←	1 2 3 4 5 ButChrom + (CHR)
Phase	Wasser	→	(AS)+CHR AS

Aus 2, 3, 4 (H_2O) konnte noch etwas CHR kristallin gewonnen werden, ebenso sehr wenig aus 1, 2, 3 (Butanol). Der ButChrom genannte Rest in den Butanolfraktionen besteht aus den sogenannten CHR-Nebenprodukten (s.a. S. 18).

Trennung der "Partial"-Hydrolyseprodukte aus Hydrolysaten von α -Amanitin mit 2 n HCl bei 110°C . (21,5 Stunden).

Die Hydrolyse wurde, wie auf S. 57 angegeben, ausgeführt.

Die Hydrolysenprodukte wurden nach dem Abziehen über $\text{KOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$

bei Zimmertemperatur in "Essigsäure pH 2,8" gelöst und auf eine thermostatisierte Dowex-50-X-8-Säule (Kationenaustauscher nach Stein und Moore, 200-400 mesh) gebracht. Mit Essigsäure pH 2,8 und 25 ml vorgeschaltetem, magnetisch gerührtem Puffer pH 5,0 zur Erzeugung eines pH-Gradienten wurden die verschiedenen Peptide bei 50°C. eluiert. Der pH des Eluats wurde mit einer 1-ml-Durchflussszelle von Ingold (Spezialanfertigung) gemessen; in 3-ml-Fraktionen aufgefangen, zeigten die UV-Spektrogramme und Pherogramme, dass es sich hier um sehr viele, schlecht voneinander getrennte Peptide mit und ohne aromatischen Baustein handelt.

"Essigsäure pH 2,8": 60 ml Eisessig wurden mit H₂O auf 1 l verdünnt und mit Triäthylamin auf pH 2,8 eingestellt.

Puffer pH 5,0: 60 ml Triäthylamin wurden mit Wasser verdünnt, mit CH₃COOH auf pH 5,0 eingestellt und mit Wasser auf 1 l verdünnt.

Alkalische Hydrolyse.

5 mg Amanitin wurden mit 1 cm³ halbkonz. Ba(OH)₂-Lösung in einem kleinen Reagenzglas übergossen und eine Stunde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Der Ansatz zeigte allmählich eine tiefblaugrüne Farbe, die in 5 Minuten ihre grösste Intensität erreicht hatte; danach färbte sich die Lösung olivgrün, später dunkelbraun, wobei sich auch braune Flocken abschieden. Nach dem Neutralisieren mit verd. H₂SO₄ wurden der BaSO₄-Niederschlag und die Flocken abzentrifugiert und erst mit kaltem, dann mit heissem Wasser gewaschen.

Die vereinigten Lösungen wurden wie oben zur Trockene gebracht und UV-spektroskopisch und pherographisch untersucht.- Eine Probe von etwa 20 mg Amanitin wurde nach 5 Minuten auf abgespaltenes Cystein mit Nitroprussidnatrium untersucht. Sie fiel sehr schwach positiv aus.

Pyrolyse von Cystein-Hydrochlorid, α -Amanitin, Phalloidin und Heptapeptidthioäther. Gaschromatographie.

Ca. 1 mg der Substanz wurde in ein Glühröhrchen gebracht. Eine zweite Person führte eine μ l-Spritze etwa zur Hälfte

des Gläschens mit der Injektionsnadel in den Gasraum ein. Dann wurde mit schwach entleuchteter, etwa 1 cm hoher Flamme erhitzt und während der Pyrolyse (etwa 15 sec) die Spritze langsam und stetig vollgesaugt, sofort darauf in die Injektionskammer des Gaschromatographen gegeben.

An dieser Stelle möchte ich recht herzlich all denen danken, die mir gute Ratschläge gaben, mich mit Modellsubstanzen versorgt und Messungen für mich durchgeführt haben.

Es sind dies insbesondere:

Herr Dr. H. Fritz	(Aufnahme von NMR-Spektren und deren Diskussion)
Herr Dr. H. Determann	(Pherographie-Hinweise und Hydrolysenratschläge)
Frln. R. Lünse	(Messungen am Aminosäureanalysator)
Herr Dipl.-Chem. E. Heine	(Gaschromatographie)
Herr Dipl.-Chem. D. Grimm	
Herr D. Rempel	(Modellsubstanzen)
Herr U. Gebert	

Lebenslauf.

Am

31. 12. 1933 wurde ich als Sohn des Reichsbankdiätars
Johannes Pfaender und seiner Ehefrau Käthe,
geb. Schneller, in Siegen geboren.
- 1940-1944 Besuch der Grundschule und des humanistischen
Gymnasiums in Brieg/Bez. Breslau, bis zur
Flucht am
20. 1. 1945 vor den russischen Streitkräften nach
Rechberghausen/Kr. Göppingen.
- 1946-1950 Oberrealschule in Göppingen
- 1950 Besuch der Wöhlerschule - Oberrealgymnasium -
Frankfurt/M, wo ich am
15. 3. 1953 das Abitur bestand.
- WS 1953/54 Beginn des Chemiestudiums an der Johann-Wolfgang-
Goethe-Universität, Frankfurt/M.
30. 11. 1956 Diplomchemiker-Vorexamen
Diplomarbeit über α -Aminoaldehyde bei Herrn
Professor Dr. W. Ried und am
11. 7. 1960 Diplomchemiker-Hauptexamen.
1. 8. 1960 Beginn der Doktorarbeit unter Herrn Professor
Dr. Th. Wieland.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren

Dr. Th. Wieland, Dr. W. Ried, Dr. P. Royen, Dr. H. Hartmann,
Dr. M. Czerny.

